

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**DESARROLLO DE UN MODELO SEMIEMPÍRICO DE
SISTEMA PROTOCELULAR AUTOMANTENIDO CON
CIERRE METABÓLICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Gabriel Piedrafita Fernández

Bajo la dirección de los doctores

**Federico Morán Abad
Kepa Ruiz Mirazo
Francisco Montero Carnerero**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



DESARROLLO DE UN MODELO SEMIEMPÍRICO DE SISTEMA PROTOCELULAR AUTOMANTENIDO CON CIERRE METABÓLICO

Gabriel Piedrafita Fernández

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Federico Morán Abad, Kepa Ruiz Mirazo y Francisco Montero Carnerero

Madrid, 2013

“An organism is not simply a mixture but a system of interacting molecules. It is therefore to these interactions that we must look for an elucidation of biological behavior...” [Kacser, 1963]

Agradecimientos

No sería adecuado comenzar este trabajo sin una mención expresa a aquellas personas que han contribuido, de una manera u otra, a la elaboración de esta Tesis doctoral:

A Kepa, Paco y Fede, directores de la Tesis, a los que les estoy muy agradecido por su dedicación y asesoramiento. Ha sido un verdadero placer trabajar con ellos, por su gran conocimiento científico y su enorme dimensión humana.

A Athel y Marilú, por abrirme muy generosamente la posibilidad de analizar el modelo metabólico que ha servido como punto de partida y fuente de inspiración del trabajo de investigación. Gracias a ellos pude introducirme en el mundo de los sistemas con cierre metabólico. Ha sido un privilegio colaborar con ellos.

A Pierre-Alain, por acogerme en su equipo durante las dos estancias en Dinamarca y compartir conmigo su amplia experiencia en el trabajo con vesículas de ácidos grasos. Gracias por esas fructíferas discusiones. Gracias también a todo el equipo del FLinT Lab, especialmente a Steen, Martin, Sarah, Harold, y Rafal por su constante cercanía, disponibilidad y ayuda.

A los que han sido mis compañeros de batalla en el día a día en el laboratorio de Biofísica: Laura, Héctor, Sara, Arturo, Daniela, Clara y Miguel. Gracias por su apoyo, generosidad y simpatía. Gracias por esas otras conversaciones también importantes para “comprender” la Vida: cine, palos flamencos, series del momento, gastronomía regional...

Al grupo de Evolución Molecular del CAB: Esteban, Susanna, Carlos, Esther, Jacobo, Michael, Jaime, con los que hemos compartido regularmente seminarios interdisciplinarios de gran interés.

Al grupo de Lógica y Filosofía de la Ciencia de la UPV/EHU, siempre tan acogedor. A Álvaro por su interés en el trabajo de esta Tesis y por sus aclaraciones conceptuales. También a la Unidad de Biofísica de la UPV/EHU, que ha sido mi primera escuela sobre biomembranas.

A otros enormes científicos y personas que he tenido la suerte de conocer por el camino y compartir discusiones científicas: Fabio, Ugo, José Luis, Miguel Ángel, Rosa, Bernat, Ben, Carlos, etc.

Por último, y no menos importante, a mi familia y amigos por su apoyo y cariño tanto en los buenos como en los malos momentos. Sin ellos, esta Tesis sobre la “previda” (como la llaman algunos) no habría sido posible. Ahora ya sí, es momento para continuar la lectura. Si usted es curioso y ha llegado hasta este punto, ¿cómo no proseguir con un tema tan interesante como el origen de la vida?

Índice general

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN EN INGLÉS / EXTENDED ABSTRACT	IX
Introduction	ix
Objectives	x
Results	xi
Conclusions	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Caracterización organizativa de lo vivo	1
1.2 Aproximaciones a la organización básica de la vida	3
1.2.1 Teoría de conjuntos autocatalíticos o redes autocatalíticas	4
1.2.2 Teoría del Hiperciclo	5
1.2.3 Teoría del Chemotón	6
1.2.4 Teoría de sistemas (M,R)	8
1.2.5 Teoría de la autopoiesis	12
1.3 Organización y origen de la vida	14
2 OBJETIVOS	21
3 UN SISTEMA (M,R) SIMPLE COMO POSIBLE MODELO PROTOMETABÓLICO	23
3.1 Modelo cinético	23
3.2 Análisis estequiométrico	26
3.3 Análisis de soluciones estacionarias	28
3.3.1 Estudio de estabilidad de estados estacionarios	30
3.4 Análisis dinámico determinista	31
3.4.1 Dependencia de concentraciones iniciales	31
3.4.2 Multidimensionalidad y construcción de un diagrama de fases	34

3.4.3 Dependencia de velocidades de degradación: diagrama de bifurcación	36
3.4.4 Dependencia de velocidades de degradación: balance entre modos elementales.....	39
3.4.5 Robustez dinámica.....	40
4 CONFINAMIENTO DEL SISTEMA EN VOLÚMENES PEQUEÑOS: EFECTO DE LAS FLUCTUACIONES EN EL AUTOMANTENIMIENTO	43
4.1 Adaptación del modelo cinético y consideraciones de simulación.....	44
4.2 Ecuación maestra y soluciones estacionarias estocásticas	45
4.3 Análisis dinámico estocástico	47
4.3.1 Condiciones iniciales de simulación.....	47
4.3.2 Estados cuasiestacionarios estocásticos	48
4.3.3 Dependencia de condiciones iniciales	50
4.3.4 Restricciones cinéticas al automantenimiento	53
4.3.5 Tiempo de recuperación y de extinción.....	54
4.3.6 Estabilidad global y volumen crítico.....	56
5 EL SISTEMA EN UN ESCENARIO DE SÍNTESIS BASAL NO CATALIZADA DE INTERMEDIARIOS	65
5.1 Modelo cinético	66
5.2 Soluciones estacionarias y dependencia de velocidades de degradación.....	68
5.2.1 Histéresis y capacidad de autoconstrucción	71
5.3 Análisis dinámico estocástico	73
5.3.1 Modos de la distribución estacionaria estocástica y posibles distribuciones transitorias cuasiestacionarias	73
5.3.2 Diagramas de bifurcación estocástico.....	77
5.3.3 ¿Existe un volumen crítico?.....	78
6 PROPIEDADES FÍSICAS DEL COMPARTIMENTO PREBIÓTICO: EFECTOS DEL CAMBIO DE COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA	85
6.1 Modelo experimental.....	86
6.1.1 Diseño y puesta a punto de un protocolo de preparación de vesículas de composición mixta	88
6.2 Influencia de la composición en la estabilidad vesicular	89

6.2.1	Sensibilidad vesicular al pH	89
6.2.2	Sensibilidad vesicular a la concentración: cálculo de la CVC	92
6.3	Influencia de la composición en la permeabilidad vesicular	94
6.3.1	Validación del procedimiento de encapsulación.....	95
6.3.2	Liberación del soluto encapsulado y cálculo de la permeabilidad	100
6.3.3	Permeabilidad dependiente de composición de membrana	104
7	ENCAPSULACIÓN DEL SISTEMA PROTOMETABÓLICO EN UN COMPARTIMENTO PREBIÓTICO: IMPLICACIONES CINÉTICAS DE LA DIFUSIÓN LIMITADA DE NUTRIENTES	107
7.1	Modelo cinético.....	108
7.2	Soluciones estacionarias y dependencia de velocidades de incorporación de precursores	110
7.3	Restricciones a la permeabilidad: implicaciones sobre la escala temporal de los procesos protometabólicos internos	115
8	ENCAPSULACIÓN DEL SISTEMA PROTOMETABÓLICO EN UN COMPARTIMENTO PREBIÓTICO: DINÁMICA PROTOCELULAR.....	121
8.1	Modelización de la estructura y dinamismo vesicular	122
8.1.1	Elaboración de un modelo cinético de vesícula prebiótica	123
8.1.2	Dinámica estocástica e inestabilidad vesicular inducida por ruido	126
8.2	Modelización de la permeabilidad a través de membrana	131
8.2.1	Modelo cinético.....	131
8.2.2	Dinámica estocástica: permeabilidad dependiente de composición de membrana	136
8.3	Funcionamiento y estabilidad dinámica global del sistema protocelular	139
8.3.1	Modelo cinético.....	139
8.3.2	Dinámica estocástica y condiciones de viabilidad.....	142
8.4	Transición hacia una protocélula plenamente autoprodutiva y con potencial reproductivo	147
9	DISCUSIÓN.....	159
9.1	Cierre metabólico y automantenimiento en condiciones prebióticas.....	159
9.1.1	Degradación y pérdida de catalizadores primitivos	163

9.2	Compartimentación en condiciones prebióticas.....	166
9.2.1	Volumen de confinamiento en compartimentos primitivos.....	167
9.2.2	Accesibilidad limitada de nutrientes en compartimentos prebióticos	170
9.3	Origen del metabolismo vectorial: un nuevo paso hacia la organización biológica.....	176
10	CONCLUSIONES.....	183
11	MATERIAL Y MÉTODOS	185
11.1	Metodología experimental	185
11.1.1	Materiales.....	185
11.1.2	Preparación de vesículas lipídicas	185
11.1.3	Determinación de la concentración crítica de agregación vesicular (CVC).....	186
11.1.4	Encapsulación del soluto y análisis de su liberación.....	186
11.1.5	Cálculo de permeabilidad.....	186
11.2	Análisis estequiométrico de redes metabólicas	187
11.3	Estudio dinámico de sistemas compartimentados.....	188
11.3.1	Arquitectura del programa ENVIRONMENT	189
11.3.2	Método de cálculo utilizado en la simulación estocástica	190
11.3.3	Consideraciones generales en la modelización del compartimento.....	193
11.4	Otros métodos numéricos de análisis computacional.....	197
11.4.1	Cálculo numérico de soluciones estacionarias.....	197
11.4.2	Análisis de estabilidad de estados estacionarios.....	197
11.4.3	Análisis dinámico determinista	198
APÉNDICE I	199
	Cálculo simbólico de soluciones de estado estacionario.....	199
APÉNDICE II	201
	Integración de la ecuación de flujo osmótico a través de membrana y consideraciones para el cálculo de la permeabilidad.....	201
APÉNDICE III	205

Código de MATLAB desarrollado para el análisis determinista de un compartimento lipídico modelo permeable a nutrientes.....	205
RELACIÓN DE SIGLAS.....	209
BIBLIOGRAFÍA.....	211

Resumen en inglés / Extended abstract

Introduction

It is difficult to tackle the problem of the origin of life without a notion of what life is and how it behaves. Probably, the concept of self-organization constitutes one of the keys for understanding biological systems and, in particular, their emergence from a prebiotic scenario of complex but still inert chemical systems. The study of irreversible processes and the development of far-from-equilibrium thermodynamics (mainly following Prigogine's school (Nicolis and Prigogine, 1977), together with the know-how and dynamic characterization of diverse self-organizing phenomena in living beings, has given some important clues to unravel possible principles involved in this transition to living matter. However, they have proved clearly insufficient.

Beyond self-organization, a certain idea of *closure* appears at the basis of most theories of the living that have proposed and attempted a universal characterization of biological systems from its most elementary level (Letelier et al., 2011). These theories claim that living entities should indeed be distinguished by a common, fundamental type of organization and offer solutions to model and characterize it, determining in this way what constitutes the essence of every living system and the reason for its being alive. In this context, the notion of organizational closure appears expressed in various different formalisms and with different degrees of precision among the distinct theories, but they are usually rooted in a common concern: the fact that living organisms must not only organize themselves from within; they must also maintain their organization in the face of changes in their environment and the continuous degradation of their components, highlighting the need of active molecular mechanisms (self-construction) to achieve self-maintenance. This problem is specially addressed in the theory of *autopoiesis* (Varela et al., 1974) and the theory of *(M,R) systems* or *metabolism-repair systems* (Rosen, 1971). According to Rosen, organisms are closed to efficient causation, which means that all the catalysts (efficient causes) required for an organism to stay alive must be products of the organism activity itself.

From the previous claims, it follows that the question of the origin of life should be faced hand in hand with the problem of the origin of its organization. Unfortunately, most of these basic theories of life were posed in rather abstract terms, so the need to contrast and relate them to realistic kinetic models that exhibit physically-grounded dynamics becomes apparent. Conversely, most experiments and explanations about the origin of life have traditionally neglected this type of organizational requirements and have focused on the chemical synthesis and characterization of particular biopolymers, such as RNA molecules, with special template/catalytic properties and alleged evolutionary capacities. This type of approach encounters two fundamental problems. First, there is no evidence of prebiotic synthesis of large biomolecules (more in particular, polynucleotides). And secondly, the emphasis on the study of the individual properties of molecules within living beings overlooks the crucial importance of their *integration* into a self-organized system that must be distinguished from its environment.

In the recent times, more systemic approaches are being developed in the origin of life research field, according to which special attention should be given to interactions among individual functional components (Szostak et al., 2001). In particular, the cellularity or compartmentation has been suggested as a fundamental step to successfully achieve the type of integration needed for life (Deamer, 1997; Luisi, 2006). New research avenues have described

interesting properties among self-assembling membranous structures made of simple lipids, which deserve more exploration (Walde et al., 1994a; Hanczyc et al., 2003; Chen et al., 2004; Mansy et al., 2008). At the same time, these advances in complex chemistry may offer an unprecedented opportunity for further studies that exploit the dynamic possibilities of systems combining self-organizing chemical networks with self-assembling phenomena (Ruiz-Mirazo et al., 2013). These new lines of research will surely contribute to clarify how complex chemical systems could have moved to more complex forms of proto- or infra-biological organization in non-homogeneous chemical domains.

In that general research context, the main purpose of this PhD dissertation is the design and development of a plausible kinetic model of a self-maintaining protocell system that combines a realistic, biologically inspired compartment and a relatively simple “metabolic” (i.e. catalytically closed) reaction network, satisfying the conceptual organizational requirements. This model will be checked both computationally (*in silico*) and experimentally (*in vitro*), with the aim to discern which are the material and spatio-temporal requisites for its correct operation and progress in a realistic, natural setting. Thus, a series of physical-chemical constraints for the self-maintenance will be derived from the analysis, which is not only intended to give clues about the range of possible scenarios for the appearance of life, but also to shed light about the possible requirements for protocell organization and, thereby, about the requisites that its main molecular components ought to fulfill, both in terms of their nature and possible interactive and evolutionary potential.

Objectives

Within the general purpose of designing and developing a simple but realistic semi-empirical protocell model, the following more specific objectives can be distinguished:

1. Computational analysis of the structural and dynamic properties of a simple model of an (M,R) system, conceived as a protometabolic reaction network with a self-productive organization. Determination of the kinetic requirements for its self-maintenance.
2. *In vitro* analyses of the physical properties of stability and permeability of vesicles made of simple amphiphiles, used as models of primitive compartments. Assessment of the possible effects of membrane lipid composition changes on the permeability of the primitive compartments to prebiotic nutrients.
3. Development of a semi-empirical model of an encapsulated protometabolism that combines in a realistic way the kinetic features of the reaction network model with the basic geometrical, structural and physical attributes of vesicular compartments. Study the interplay between the dynamic constraints imposed on each other by the metabolism and the membrane, determining, by means of computational analyses, the physical-chemical limits to the overall stability and viability of the protocellular system.
4. Exploration of the dynamic possibilities that a coupling between the chemical network and the compartment could open, through the inclusion in the model of an internal process leading to lipid synthesis. Evaluation of the potential capabilities of the model to build increasing levels of complexity, both from a molecular and an organizational perspective.

Results

Based on a previous model of metabolic closure that captures the essence of an (M,R) system (Letelier et al., 2006), a simple self-producing metabolic system has been studied here as a plausible model of a protometabolism (Piedrafito et al., 2010). This illustrates by means of three interlocking catalytic cycles the three fundamental processes envisaged by Rosen (1991): *metabolism*, *replacement*, and *organizational invariance*. A first deterministic analysis of the kinetic model shows that such a theoretical system is able, for a wide range of values in the parameter space, to replenish its own catalysts despite their continuous loss by irreversible degradation, thus achieving a robust self-maintaining regime (i.e. a stable steady state of non-null concentrations of all its metabolites). The degradation rates of the catalysts involved constitute a critical feature of the model, as the system collapses if the value of the degradation rate constants is too high compared with the values corresponding to the constructive or condensation processes. In such cases the catalysts are eliminated faster than they are regenerated.

Interestingly, as long as the values of the rate constants for catalyst degradation are relatively small, the system can withstand substantial perturbations of the concentrations of most of its constituents and recover. It appears, therefore, to be a possible model of a robust protometabolism (Piedrafito et al., 2010). In those parameter conditions *bistability* is observed: the non-trivial stable steady state coexists with a trivial steady state characterized by the extinction of all species, separated from each other by a separating barrier associated with a third steady state that is unstable (a saddle point). This separating barrier is located close to the trivial solution for a wide range of parameter values, indicating that perturbations have to be of a great magnitude in order to provoke the collapse of the system.

In a subsequent part of the work, it has also been shown that the inclusion of the non-catalyzed intermediate-forming processes in the model does not qualitatively alter the non-trivial steady state and its behaviour. However, this implies the disappearance of the trivial steady state and the emergence of a non-operational residual steady state of minimal concentrations of the intermediates. Moreover, this addition in the model has a clear impact on the self-construction capacity of the system. If the former reaction network could be nucleated just from vanishing initial concentrations of some of the intermediates used as a seed, now it can emerge spontaneously without the presence of any intermediate at the beginning, because a new regime of monostability of the non-trivial, functional solution arises in the parameter space, next to the bistability region. This acquires special significance in a scenario of the origin of life, where the first protometabolisms should have formed *de novo* from prebiotic nutrients available in the environment. However, other factors should be addressed to analyze more thoroughly the possibilities of emergence and maintenance of this type of self-productive systems, and thus their actual relevance in the origin-of-life context.

As a first step to evaluate the proto-metabolic model in more realistic prebiotic conditions, its confinement in small volumes turns to be the focus of the analysis next: more specifically, volumes similar to those that may have existed in the vicinity of mineral particles or inside prebiotic compartments, so frequently envisaged as natural scenarios for the origin and early evolution of life. A stochastic analysis has been performed in this context to study the effect of the fluctuations generated by internal noise (Piedrafito et al., 2012a). This analysis confirms the capacity of the system to reach a robust self-maintaining regime. Nevertheless, the internal noise, and thus the confinement volume, plays a critical role in the evolution of the system towards recovery or extinction. In fact, even though the response to threatening perturbations of concentrations is faster for smaller system volumes, too small volumes are incompatible with self-

maintenance and unavoidably lead to global system collapse: a noise-induced phase transition appears for a certain critical value of the volume.

A second type of constraint, related with an early encapsulation of the protometabolism in a prebiotic compartment, is then approached, as derived from the theoretical-computational analyses characteristic of this work. In addition to the degradation rates of the catalysts and the system volume, now the diffusion rates of precursor molecules through the membrane turn out to be also critical factors for the viability of the protometabolic model system in a closed lipid vesicle (Piedrafita et al., 2012b). The limited accessibility of the external nutrients to the internal reaction domain entails a potential problem of self-suffocation (Szathmáry, 2007), since the nutrient supply must fit the internal metabolic demand. Here it is shown, through a concrete example, that the membrane permeability values limit the characteristic time scales at which the bounded protometabolic processes might occur. But how does this relate with the currently available experimental data on the physical properties of prebiotic compartments?

As a further step in this direction, and precisely in order to support the *in silico* approach with experimental *in vitro* results, stability and permeability properties of diverse types of vesicles made of mixtures of simple amphiphiles, suggested as models of primitive compartments, have been also determined. The focus at this stage has been paid on lipid vesicles formed from binary combinations of lauric acid (LA), a prebiotically relevant fatty acid, with diverse relative concentrations of glycerol monolaurate (GML) and dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC) – as two plausible derivatives of LA, which might have modified the composition of the first primitive membranes. Vesicles made of more complex lipids (such as mixtures of oleic acid with glycerol monooleate OA/GMO) have been studied too – as models of more evolved membranes. The experimental assays on the aggregation efficiency at different pH values, as well as the sensitivity test to the concentration (determination of the critical concentration for the formation of vesicles, or CVC) reveal that both the enrichment in GML and in DLPC confers stability to the LA-based compartments. Quite surprisingly, the membrane permeability measurements (carried out through experiments of encapsulation and release of an entrapped fluorophore) indicate that these types of stabilizing mixtures also endow an improved permeability to vesicles of LA, whereas other mixtures with longer amphiphiles (OA/GMO) which would generate stable compartments too, would have the disadvantage of reducing the permeability.

From the integration of the computational and experimental work carried out so far, it can be derived that as primitive membranes became more and more enriched in internally synthesized stabilizing lipids, probably they would have needed to develop, in parallel, mechanisms to compensate for the decrease in nutrient permeability (Piedrafita et al., 2012b). In this sense, the early internal production of short-chain lipid derivatives (differing in the size and shape of the polar head groups – like monoacyl glycerols or monoacyl phosphoglycerides) could have been an advantage for the development of more efficient encapsulated metabolisms, and thus, it might well have preceded the formation of specific transport machinery, as a more simple and primitive mechanism that could modulate and facilitate nutrient accessibility.

Finally, once all the previous spatio-temporal constraints have been considered, a simple semi-empirical kinetic protocell model is presented, based on the viability conditions for the complete, encapsulated protometabolic model. This more realistic and inclusive protocell model, combining the dynamic attributes of the membrane boundary with the kinetic specificities of the reaction network in a common framework of analysis, fulfils the physical-chemical requirements and exhibits robust self-maintenance properties as well. In addition, it has constituted a good starting point for further investigations on subsequent protocellular stages and evolutionary

transitions under current development. More concretely, the dynamic consequences of coupling the model protometabolism to the surrounding membrane have been explored through different schemes that envisage the internal production of a lipid. In these cases, new constraints arise (mainly related with problems of osmotic pressure and lack of synchronization between membrane growth and metabolic activity), revealing some additional issues that should be tackled in future work. In any case, the relatively high and robust capacity already shown by these systems to reach self-productive and self-reproductive regimes allows us to regard them as a very relevant tenable point for studying the origin of life from a bottom-up perspective.

Conclusions

The main conclusions of this PhD dissertation, which constitute the thesis of the work here undertaken, are listed below:

1. A simple system consisting of a few intertwined catalytic reactions organized so that all catalysts are produced within the network can be capable of self-construction and can achieve a self-maintaining regime characterized by functional non-null concentrations of all its constituents, despite the continuous degradation and loss of the catalysts involved. The relative – dynamic and structural – robustness of this regime allows to postulate it as a plausible model of protometabolism.
2. The confinement volume and the limitations in nutrient uptake (due to the presence of a membrane) are potential critical factors for the development of a self-productive chemical reaction network inside a vesicular compartment. Accordingly, the time scale of the emerging protometabolic processes must have been constrained by the permeability of the primitive compartments to prebiotic nutrients available in the environment.
3. Certain simple amphiphilic compounds, such as monoacyl glycerols or monoacyl phosphoglycerides, can enhance the stability of vesicles made of prebiotically-relevant short-chain fatty acids and, at the same time, endow them with higher permeability to diverse nutrients. Thus, in a scenario of prebiotic evolution, the endogenous production of this type of lipid derivatives could have provided a primitive control mechanism for the stability and the permeability of precursor membrane compartments, being suitable for the development of more efficient internal metabolic processes.
4. Self-reproductive dynamics can be induced through the chemical coupling between a self-productive metabolism and the vesicular compartment surrounding it by means of an internal process of synthesis and control of membrane components. This multiplication regime is robust and accessible from a wide area in parameter space, at least computationally. The emergence of a protocellular organization with these features could have constituted a cornerstone as a flexible platform for the subsequent building of growing levels of complexity, in a scenario necessarily characterized by the coevolution of metabolism and membrane.
5. A closer intertwining between the conceptual-organizational requirements involved in the assembling of this type of systems and the development of realistic kinetic models compatible with the physical-chemical constraints of the prebiotic context is essential to make significant progress in the understanding of the origin and early evolution of life. A proper combination of experimental and theoretical-computational methodologies,

following a semi-empirical approach like the one that has been taken up here, constitutes a novel, necessary and fruitful strategy for future contributions to the origin of life research field.

Capítulo 1

1 Introducción

1.1 Caracterización organizativa de lo vivo

El origen de la vida es sin duda una de las cuestiones abiertas fundamentales de la biología. Sin embargo, para poder responder a la pregunta de cómo se originó la vida, se hace preciso responder primero a qué se entiende por vida. A pesar de la facilidad que existe para reconocer lo vivo de lo no vivo, todavía no se dispone de una definición inequívoca de qué es la vida. Numerosos científicos han tratado a lo largo del siglo XX de recoger las características *esenciales* que reúnen los sistemas vivos, pero el problema continúa abierto (Gayon et al., 2010; Deamer, 2010). Una de las mayores dificultades a las que se enfrentan estos autores consiste en aportar una definición *universal*, que no excluya a ninguno de los seres vivos conocidos, y a la vez no incluya a elementos no vivos. En este sentido, en muchas ocasiones se ha definido la vida por su capacidad para reproducirse y evolucionar por selección natural. Pero una definición de este tipo también resulta insuficiente, ya que no puede abarcar a ciertos seres vivos como son algunos mutantes o animales híbridos estériles. Es posible que haya que recurrir a un nivel mayor de abstracción, como propone Langton, al sugerir provocativamente que una definición universal de vida no sólo ha de satisfacer la vida tal como se conoce en la Tierra, sino también la vida tal como podría ser (Langton, 1989; Rudomin, 1999). Precisamente, esta distinción ha permitido el surgimiento de toda una nueva disciplina como es la *vida artificial*.

Con anterioridad, algunos científicos, como Rosen o Varela (Rosen, 1972; Maturana y Varela, 1973), ya plantearon resolver el problema desde este nivel más profundo y universal, tratando de determinar el tipo de *organización* genérica que caracteriza a un ser vivo, a un organismo, de forma necesariamente previa al análisis de sus capacidades reproductivas o evolutivas. La propia palabra *re-producción* evoca ya, según Maturana y Varela, la aceptación de una cierta organización particular subyacente. Efectivamente, si los sistemas vivos pueden ser reconocidos como entidades, sus propiedades constitutivas no pueden ser deducidas sólo de la fenomenología que caracteriza a cada uno de sus componentes, sino que deben residir en el conjunto de interacciones entre esos elementos, que es precisamente lo que constituye la esencia de un sistema vivo como un todo, como una *entidad* (Varela et al., 1974). De esta manera, más allá de preguntarse cuáles son las propiedades necesarias de los componentes de un sistema que lo

hacen ser vivo (visión reduccionista), debe cuestionarse fundamentalmente cuál es la organización necesaria y suficiente de dicho sistema para poder considerarlo vivo, entendiendo la organización como el conjunto de relaciones entre componentes que define al sistema complejo como entidad (visión holista).

Con este nuevo enfoque, lo que describa y defina inequívocamente a todos los sistemas vivos debe ser una organización común, que es precisamente aquella que permite reconocerlos como “vivos” *in situ* (es decir, aquí y ahora). Este cambio de paradigma es muy importante, ya que permite entender la gran diversidad de estructuras biológicas en términos de diversos modos de implementación de una misma forma de organización. Así, con respecto a su organización, los sistemas biológicos pasan a ser miembros de la misma clase de sistemas (es decir, se pueden reconocer como una *clase natural*), puesto que a pesar de estar hechos de diferentes componentes, mantienen unas propiedades generales que permiten vincularlos a todos ellos. De esta manera, además, el conjunto de posibles estructuras biológicas queda restringido a aquellas que cumplen dichos requisitos o relaciones generales.

No obstante, es importante destacar que el modo en que un sistema biológico se organiza no es ni puede ser cualquiera. Esto constituye uno de los problemas más habituales en los que caen los planteamientos de vida artificial más radicales (la denominada “*strong Alife*”), los cuales encaran el problema de manera excesivamente abstracta. Para el establecimiento de una organización dinámica (como lo es la de los seres vivos) hay una serie de requerimientos energético-materiales de carácter muy general, los cuales se hacen evidentes una vez se acepte que el origen y mantenimiento del mundo biológico debe ocurrir en un dominio físico-químico realista (Schrödinger, 1944; Morán et al., 1996; Moreno y Ruiz-Mirazo, 1999).

La termodinámica alejada del equilibrio y el estudio de procesos de autoorganización, siguiendo la escuela de Prigogine (Nicolis y Prigogine, 1977; Prigogine y Stengers, 1979), aporta algunas de las claves para entender las restricciones a la realidad biológica. La autoorganización, así entendida como un fenómeno sistémico en el que a partir de un conjunto de elementos débilmente interrelacionados se genera espontáneamente un patrón global dinámico de orden (Ruiz-Mirazo, 2013), está presente tanto en algunos fenómenos físicos (por ejemplo, convección en células de Bénard) como químicos (por ejemplo, reacción oscilante de Belousov-Zhabotinsky), pero muy extensamente representada en los sistemas vivos, que hacen gran acopio de este tipo de procesos (Karsenti, 2008). El mantenimiento de una estructura disipativa (un patrón de autoorganización, alejado del equilibrio) implica una cierta recursividad en la organización de los elementos internos, que promueva su cohesión, reforzando el propio patrón generado (una limitación endógena). Y al mismo tiempo, requiere de un flujo neto continuo de materia-energía a través del sistema (restricciones externas) (Morowitz, 1968; 1992).

También ha sido muy útil para comprender la complejidad biológica el propio análisis de la dinámica autoorganizativa que tiene lugar continuamente – a distintos niveles – en los seres vivos (Montero y Morán, 1992), en conjunción con los fundamentos matemáticos de sistemas dinámicos no lineales (Abraham y Shaw, 2005), sin olvidar las aproximaciones relacionadas con teoría de grafos y basadas en el análisis de redes complejas (Kauffman, 1993). Se han descrito y estudiado en detalle fenómenos de autoorganización en contextos tan diversos como procesos de comunicación química celular, patrones morfogenéticos en el desarrollo de organismos pluricelulares, comportamientos de “inteligencia colectiva” en colonias de microorganismos o insectos, relaciones ecológicas interespecíficas, etc., caracterizándose tanto patrones temporales (Goldbeter, 2010) como espaciales (Meinhardt, 1982). En definitiva, la autoorganización se

manifiesta de manera ubicua y muy diversa en toda la fenomenología biológica, posibilitando (y constriñendo al mismo tiempo) las distintas formas que adopta lo vivo.

Pero la organización básica de los sistemas biológicos va más allá de la autoorganización en el sentido clásico, “Prigoginiano” del término (ver de nuevo (Ruiz-Mirazo, 2013)). La característica constitutiva de todo ser vivo es su capacidad para mantener con robustez su organización, a pesar del continuo desorden y las fluctuaciones que caracterizan a su entorno, lo cual provoca continuos cambios en el ambiente circundante. Esto supone que los organismos han de manejar adecuadamente el flujo de materia y energía externa para su propio mantenimiento; han de disponer de ciertos mecanismos de transducción y de *control* de dicho flujo (Ruiz-Mirazo y Moreno, 2004). Además, como es natural sus componentes están sujetos a un constante deterioro y degradación, lo que hace necesario un proceso compensatorio de construcción para el mantenimiento. Por este motivo, los organismos han de ser sistemas automantenidos, capaces de autoproducirse¹. Siguiendo la terminología de Aristóteles², si bien la *causa material* de los organismos proviene de su entorno, su *causa eficiente* reside en sí mismos, ya que sus funciones no pueden recaer en agentes externos como sucede en el caso de una máquina (Cornish-Bowden et al., 2007). Y muy probablemente, esta capacidad autoprodutiva que define la organización de lo vivo tuvo que ser anterior a la capacidad evolutiva.

Por tanto, en el origen de la vida, resulta de especial importancia explicar la transición química hacia la vida en términos del origen de su organización. Pero ahora bien, ¿cuál es la verdadera esencia de esta organización de lo vivo?

1.2 Aproximaciones a la organización básica de la vida

La organización biológica debe ser compatible con las leyes de la física y la química. Además, puesto que sus bases son evidentemente moleculares, es fundamental realizar un análisis bioquímico, estudiando en particular cómo se materializa y relaciona la idea de autoproducción con una lógica circular del metabolismo, así como cuál es el vínculo con otros tipos de organización recurrente, como es la autoorganización (anteriormente tratada). La mayoría de las teorías actuales sobre la esencia de la vida, procuran explicarla en este sentido de *cierre organizativo u operativo* que emerge de formas de organización más generales (por ejemplo, patrones autoorganizativos físico-químicos) (Letelier et al., 2011). Sin embargo, estas teorías orientan el problema desde diversos puntos de vista, atendiendo a distintos criterios. Como resultado, a menudo estas aproximaciones se tienden a solapar, aunque cada una enfatiza diversos aspectos de la organización y difiere en los detalles o rasgos moleculares destacados. En ocasiones comparten aspectos semejantes, abordados con distintos lenguajes. A su vez, los modelos que ofrecen se plantean a distinta escala y abarcan la problemática en muy diversas direcciones. De esta manera, cada teoría introduce una acepción de *cierre* con algún matiz diferente y todas ellas aportan ingredientes propios de interés que fallan en las otras.

¹ Nótese que de acuerdo a esta concepción, la autoproducción no es ya un requisito necesario para el crecimiento y una eventual replicación, sino para el solo hecho del mantenimiento de la organización.

² Aristóteles distinguía cuatro categorías generales de causalidad: material, formal, eficiente y final, de entre las cuales la causa material de un objeto hace referencia a aquello que lo constituye, es decir a los elementos de los que se compone ese objeto, y la causa eficiente en cambio se refiere al agente que lo realiza o que controla el modo en que *es* ese objeto.

A continuación se describen brevemente algunas de estas teorías, incidiendo particularmente en la teoría de los sistemas (M,R) y la autopoiesis, ya que corresponden con los dos puntos de partida, las dos fuentes de inspiración principales que han llevado a la realización de los experimentos descritos en este trabajo³.

1.2.1 Teoría de conjuntos autocatalíticos o redes autocatalíticas

La teoría de los conjuntos autocatalíticos, propuesta por Kauffman (Kauffman, 1986; Farmer et al., 1986), no surgió con el objetivo principal de definir ni describir las características esenciales de la organización que caracteriza a la vida, sino más bien con el fin de explicar la emergencia espontánea de la autoorganización en la transición hacia un metabolismo primitivo. Para Kauffman, la autoorganización y el orden pudieron surgir espontáneamente a partir de relaciones aleatorias en grandes conjuntos de elementos. El punto de partida es un modelo que contempla un conjunto suficientemente amplio de elementos sencillos (en la hipótesis original, péptidos de distinto tamaño). Este modelo considera todas las posibles reacciones de condensación y rotura admisibles entre los distintos elementos metabólicos de una red, y presupone que cada elemento tiene una cierta probabilidad aleatoria de catalizar cada reacción. En primer lugar, se demuestra que el número potencial de reacciones crece más rápidamente que el número de elementos al aumentar el tamaño de la red (el tamaño máximo de los péptidos considerado) y que por tanto la densidad de relaciones catalíticas entre elementos también se incrementa. La cuestión fundamental es que a partir de cierto grado de complejidad (cierto tamaño de red) es esperable que puedan trazarse largas rutas de reacciones consecutivas catalizadas, originándose subconjuntos catalíticos (Luisi, 2006). Y como consecuencia, inevitablemente, de entre estos subconjuntos catalíticos debieron emerger espontáneamente sistemas autorreplicativos como una propiedad colectiva autoorganizativa de los sistemas peptídicos complejos en la química prebiótica. Kauffman (1986) denominó a estos sistemas *subconjuntos autocatalíticos* (Figura 1.1A).

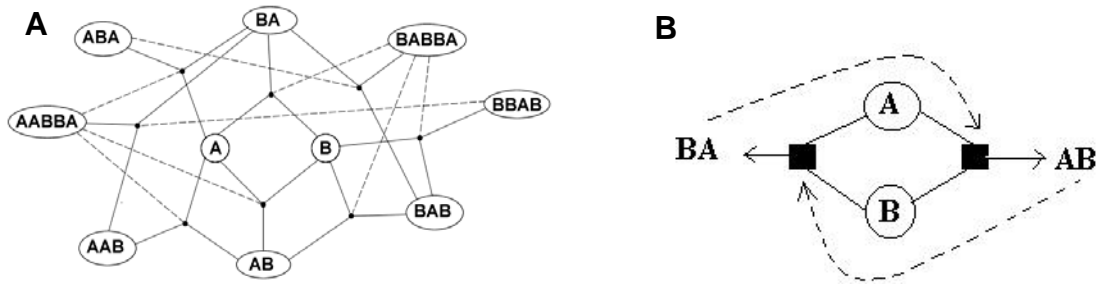


Figura 1.1 Esquema de dos modelos de conjuntos autocatalíticos. Las flechas continuas representan transformaciones, y las flechas discontinuas, funciones catalíticas. (A) Representación esquemática de una red autocatalítica con múltiples elementos. (B) Esquema de un modelo sencillo de conjunto autocatalítico. En este caso está constituido por cuatro elementos: dos monómeros (A y B) y dos dímeros (AB y BA). Cada uno de los dos dímeros se forma por condensación de los monómeros simples. Ambas reacciones de producción de AB y de BA están catalizadas a su vez por los productos BA y AB, respectivamente. La red resultante es autocatalítica, ya que todos los catalizadores implicados residen en la propia red; dado un aporte de moléculas sencillas tipo A y B, la red se mantiene a sí misma indefinidamente. Imágenes extraídas de (Kauffman, 1995).

Kauffman entiende así que el cierre organizativo se explica por ciertas relaciones de catálisis entre elementos que a través de una serie de interacciones operan en su propio beneficio,

³ Debe señalarse que el orden de exposición de las distintas teorías no responde a un criterio cronológico, sino que es el que se ha considerado más conveniente de cara a los argumentos que se expondrán más adelante.

constituyendo circuitos autorreplicativos que globalmente se autocatalizan (Figura 1.1B). Cada elemento catalítico debe ser causa eficiente de catalizadores que a su vez lo producen. Por tanto, concibe el cierre organizativo como una condición de *cierre catalítico*, que él explica en los siguientes términos: “*todo miembro del (sub)conjunto autocatalítico ha de tener al menos una de las posibles reacciones que lo forman catalizada por otro miembro del conjunto, y debe ser posible explicar, a través de secuencias de reacciones catalizadas, la formación de todos y cada uno de los miembros a partir de la fuente de recursos primarios (monómeros)*” (Kauffman, 1986). Debe señalarse que recientemente han surgido ciertas teorías más elaboradas, inspiradas en el modelo original de Kauffman, pero que introducen algunas modificaciones respecto al trabajo anterior (para una revisión ver (Hordijk et al., 2010)).

1.2.2 Teoría del Hiper ciclo

Tras los descubrimientos clave de la biología molecular a mediados del siglo XX, surgió en algunos científicos la motivación de comprender el origen de las capacidades autoorganizativas y evolutivas que despliegan los seres vivos en términos de dinámicas de población de biopolímeros con capacidad replicativa de tipo *template* (como RNA o DNA). La Teoría del Hiper ciclo se elaboró precisamente con ese objetivo, como una herramienta de análisis dinámico de la organización y de las propiedades evolutivas de conjuntos de moléculas autorreplicativas interrelacionadas. Eigen y Schuster (1977) propusieron un modelo en el cual demostraban cómo la autorreplicación individual conduce a un “*cuello de botella evolutivo*”, a no ser que varios elementos autorreplicativos diferentes (supuestamente, moléculas de RNA) se organicen en un ciclo de reacciones en el cual cada elemento promueva su propia replicación así como la de otros elementos autorreplicativos del ciclo. A este conjunto cíclico le denominaron hiper ciclo (Figura 1.2).

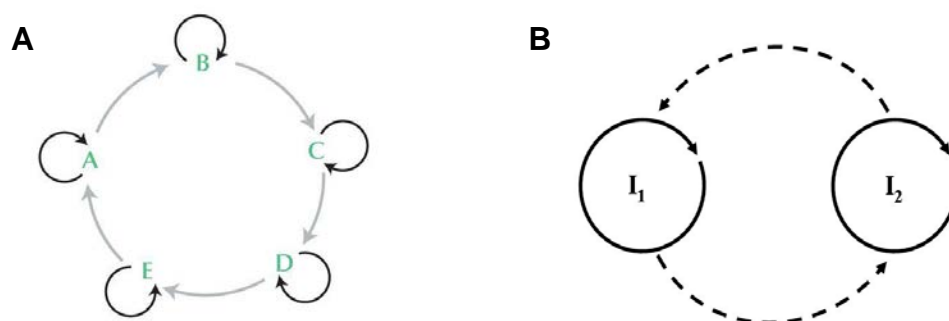


Figura 1.2 Esquema de las relaciones catalíticas en dos modelos de hiper ciclo. (A) Representación esquemática de una organización hipercíclica con cinco elementos autorreplicativos. Extraída de (Barton et al., 2007). (B) Esquema de un sistema hipercíclico mínimo, constituido por dos elementos autorreplicativos I_1 y I_2 . Las flechas continuas representan la capacidad autorreplicativa de cada elemento y las flechas discontinuas su capacidad para promover la replicación de otros elementos del ciclo.

El modelo de Eigen y Schuster cobró mayor fuerza con el descubrimiento (a comienzos de los años 80) (Cech et al., 1981; Guerrier-Takada et al., 1983) de la capacidad catalítica de ciertas moléculas de RNA (llamadas *ribozimas*). Ello permitía concebir más fácilmente los elementos de la organización hipercíclica como moléculas con actividad dual, que actúan simultáneamente como catalizadores y como portadores de información, y vincular el modelo con la hipótesis de un “*mundo RNA*” supuestamente previo a la aparición de las proteínas y del DNA (Gilbert, 1986; Joyce, 2002). De hecho, los propios Eigen y Schuster trataron de dar una explicación de la aparición del código genético a partir de estas estructuras basadas en RNA (Eigen y Schuster,

1977; Schuster, 1984). Así mismo, también propusieron modelos de hiperciclos más elaborados, de mayor orden, en los cuales ciertas funciones catalíticas se delegan en nuevos elementos distintos a los portadores de la información, es decir en enzimas proteicas.

Otro aspecto que resulta interesante es que la organización hipercíclica supone la toma de decisiones de una vez para siempre (Montero y Morán, 1992). En un posible escenario de múltiples hiperciclos compitiendo, cada uno tendría un amplio dominio de atracción, de manera que una vez establecido el hiperciclo mejor adaptado, las sucesivas mutaciones (fenotípicas), aunque ya fueran beneficiosas, no supondrían el salto a otro dominio.

El modelo del hiperciclo pretende explicar el origen de la vida en términos de la emergencia y el desarrollo de las capacidades replicativas de biopolímeros como el RNA (Eigen y Schuster, 1979). Su principal atractivo reside en que hace posible la capacidad de selección y evolución ya a nivel molecular, aunque no está exento de cuellos de botella (para superarlos se ha sugerido, por ejemplo, la necesaria aparición de la celularidad). En cualquier caso, el mayor problema que presenta el modelo es que los ingredientes materiales que pueden realizar esta organización (y la sofisticada química de reconocimiento intermolecular que lleva implícita) son demasiado complejos como posible punto de partida de la vida. Se requiere la formación espontánea de polímeros de RNA con capacidad autocatalítica como requisito previo a su organización en estructuras cíclicas, lo cual es bastante improbable en un escenario de química prebiótica (Shapiro, 2007). Por otro lado, aunque esta teoría en algún momento sí menciona explícitamente el metabolismo, no profundiza sobre la lógica operativa del mismo, lo cual es fundamental para poder entender cómo surgió un mantenimiento robusto de las primeras formas autoorganizadas. Cabe preguntarse entonces: ¿es prudente retrasar la solución a esta cuestión para etapas posteriores, más avanzadas, en las que las relaciones entre los elementos del sistema estén condicionadas y sujetas ya a un grado de complejidad organizativa todavía mayor?

1.2.3 Teoría del Chemotón

Tibor Gánti abordó la organización biológica desde una perspectiva química, centrando su atención en la organización material y las relaciones estequiométricas más básicas entre los elementos que constituyen cualquier entidad viva. Para Gánti, existen cinco criterios absolutos que satisface la vida (Gánti et al., 2003): entidad, metabolismo, estabilidad, información y capacidad de control programado. Existen además tres criterios potenciales que aunque no son esenciales para la existencia y continuo mantenimiento de un organismo vivo concreto, sí lo serían para la vida en su conjunto, ya que caracterizan a toda entidad evolutiva: crecimiento y reproducción, evolución, y muerte.

La teoría de Gánti queda recogida en el modelo del Chemotón (Gánti, 1975), ilustrado en la Figura 1.3. Este modelo reúne los criterios absolutos de la vida mencionados anteriormente y los conecta con los propios de una entidad evolutiva. El modelo del Chemotón representa un sistema químico mínimo, de naturaleza cíclica, capaz de autorreproducirse, compuesto por tres subsistemas autocatalíticos básicos: un subsistema dedicado al metabolismo, otro subsistema portador de información y un subsistema relacionado con la producción de la membrana. Los tres subsistemas están estequiométricamente acoplados, de tal manera que a través de un flujo de materia, el conjunto se comporta como una estructura recursiva de autorrealización (autoproducción).

El Chemotón es una entidad en el sentido autopoietico (ver más adelante), ya que consta de una red de producción de componentes (los tres ciclos autocatalíticos acoplados) que participan recursivamente en la misma red que los produce, y esto sucede en un espacio compartimentado.

Además, este modelo, a pesar de su alto nivel de abstracción, refleja de forma bastante clara cuál debe ser la naturaleza química de los componentes que lo forman y sus relaciones cuantitativas en las transformaciones (estequiometría). Sin embargo, lleva consigo una simplificación excesiva del comportamiento de cada uno de los subsistemas (metabólico, celular e informativo), tratados como ciclos autocatalíticos elementales, así como de su imbricación funcional (acoplamiento estequiométrico). Esta fuerte simplificación, aunque permite la concepción de sistemas relativamente sencillos con capacidad para crecer, autorreproducirse y evolucionar, no es mínimamente realista.

Más concretamente, aunque se han identificado núcleos autocatalíticos en los metabolismos de los seres vivos (Kun et al., 2008), parece bastante evidente la necesidad de topologías de red más elaboradas y componentes reguladores (catalizadores funcionales) que confieran a dichos metabolismos suficiente robustez. Por otro lado, el tratamiento del subsistema celular (membrana) como un mero módulo reactivo más, sin entrar a considerar las importantes implicaciones físico-químicas de un compartimento real, no resulta satisfactorio. Por último, el subsistema informativo y su engarce con el resto de componentes, a pesar de ser una posibilidad que merece ser explorada, carece de fundamento biológico. El problema es que profundizar en todos estos aspectos al mismo tiempo dificulta mucho la labor y daría lugar a un modelo de complejidad tal, que no ayudaría de hecho a la comprensión sobre el origen de la organización biológica.

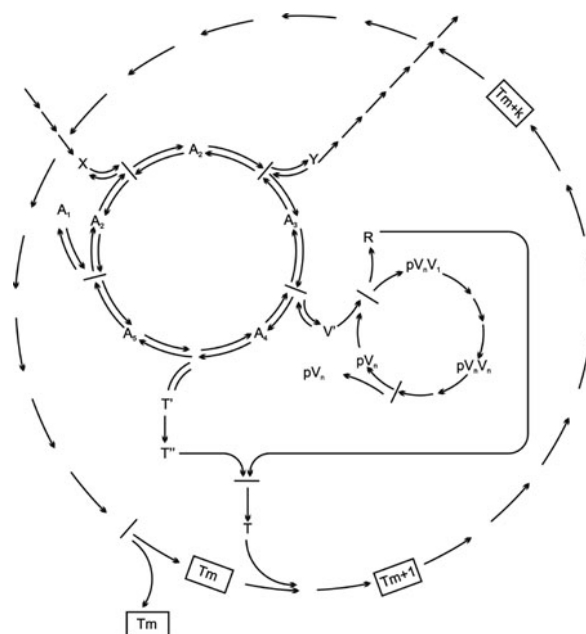


Figura 1.3 Esquema del modelo del Chemotón, donde se muestran los tres subsistemas autocatalíticos característicos así como su acoplamiento, explicitando las relaciones estequiométricas entre ellos. El ciclo metabólico (situado en el interior, a la izda) permite acoplar el flujo de entrada de materia-energía al sistema con la elongación del material portador de la información (ciclo interior, a la dcha; $pV_n \rightarrow 2 pV_n$), el crecimiento de la membrana (ciclo perimétrico; $T_m \rightarrow 2 T_m$) y su propio crecimiento ($A \rightarrow 2 A$). Como consecuencia del acoplamiento y la autoproducción de los subsistemas, el Chemotón prolifera. (Imagen extraída de (Gánti et al., 2003)).

1.2.4 Teoría de sistemas (M,R)

Rosen recurrió a las categorías de causas de Aristóteles (ver Nota al pie nº 2) para definir a los organismos vivos, atendiendo a su organización lógica, como sistemas *cerrados a causas eficientes* (Rosen, 1991). Para Rosen, lo más significativo de los sistemas vivos es que su causa eficiente, es decir el “agente” que hace al organismo ser como es, reside en ellos mismos. Es precisamente este hecho lo que permite distinguirlos de una máquina, siguiendo una tradición argumentativa que se remonta a Kant. Toda máquina requiere un agente externo para ser construida, mantenida y reparada cuando sea necesario. En cambio en un organismo, la construcción y el mantenimiento han de ser una función interna. Para profundizar en la naturaleza de esta función, Rosen decidió abordar el problema del cierre o circularidad organizativa de los organismos vivos desde un punto de vista metabólico (para una reciente revisión ver (Cornish-Bowden et al., 2007)).

Los organismos vivos pueden ser entendidos como sistemas metabólicos, constituidos por una red de reacciones de metabolitos catalizadas por enzimas que operan indefinidamente en un estado de concentraciones estacionarias. Seguramente, fue clave para el razonamiento posterior de Rosen el énfasis en la inestabilidad de cualquier objeto físico implicado en un proceso. Las enzimas y cualquier otra macromolécula de un organismo vivo no son indefinidamente estables, sino que están sujetas a cierta degradación, bien por hidrólisis o por modificaciones químicas de la molécula (por ejemplo, oxidación). Además, también pueden sufrir dilución. Por tanto, para poder continuar operando en un estado estacionario mantenido, requieren ser repuestas o reemplazadas. Puesto que los organismos no dependen de agentes externos que los mantengan, todos los catalizadores (entendidos como causas eficientes del sistema) deben ser producidos desde el propio organismo. Es decir, las enzimas y proteínas no pueden provenir de fuera, sino que han de ser productos del metabolismo. Así, los sistemas vivos son sistemas con organización cerrada, puesto que la red de procesos bioquímicos que constituye el metabolismo debe suplirse a sí misma. Este requerimiento de que las enzimas (por su naturaleza, degradables) sean continuamente sintetizadas por el propio sistema metabólico, llevó a Rosen a plantear la cuestión del cierre organizativo en términos de cómo se reemplazan las enzimas.

¿Cómo debe organizarse un sistema para operar indefinidamente? Rosen interpretó las redes metabólicas de los sistemas vivos como *sistemas (M,R)* o *sistemas metabolismo-reparación* (del inglés *metabolism-repair systems*) (Rosen, 1958a; 1958b; 1959). Estos sistemas tienen la capacidad de realizar de modo indefinido procesos *metabólicos* (M) catalizados por enzimas f , gracias a la acción de otros procesos denominados de *reparación* (R) que se encargan de reemplazar correctamente las enzimas que se degradan, utilizando para ello alguno de los productos del propio metabolismo. El principal problema para alcanzar una organización cerrada es que estos procesos de reparación requieren a su vez ciertos moduladores o enzimas ϕ que también son susceptibles de degradarse. Por supuesto, para asegurar su reemplazo, se podría contar con un segundo nivel de reparación, pero de esta manera quedaría de nuevo pendiente explicar cómo se reemplaza la enzima que participara en este nuevo proceso. Para evitar una eventual regresión al infinito, Rosen consideró la existencia de un último proceso que recae en una causa eficiente denominada β , que corresponde con algún elemento ya producido en el metabolismo (Letelier et al., 2006). De esta manera, se completa lo que Rosen (1991) denominó *cierre metabólico*, con el cual el sistema (M,R) adquiere la capacidad de mantener constante su organización, una organización por tanto circular o cerrada. En la Figura 1.4 se muestra el conjunto de relaciones esenciales que ocurren en tales sistemas (M,R) con organización constante.

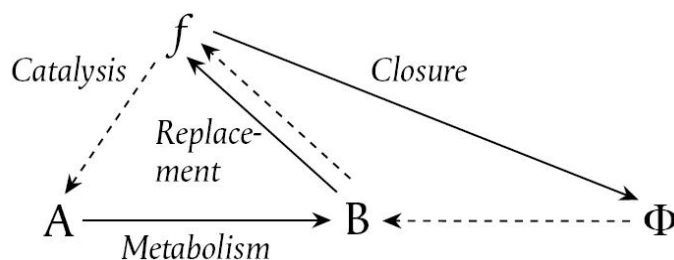


Figura 1.4 Diagrama extraído de (Cornish-Bowden et al., 2007) que ilustra la circularidad organizativa de un sistema (M, R) . Cada flecha continua representa una transformación química y cada flecha discontinua indica una función (situada al comienzo de la flecha) capaz de utilizar una variable (destino de la flecha) para producir cierto resultado. Existe una función metabólica f que opera sobre un conjunto de sustancias A para producir productos B . Otra función reparación Φ transforma productos B para recuperar f , que lógicamente está sometido a continua degradación. Por último, una función de reemplazo de la reparación β , relacionada con algún elemento de B , transforma f para regenerar Φ y completar el cierre metabólico. Cada función biológica queda así cubierta y mantenida por elementos del propio sistema, sin requerir causas externas. De esta manera, el sistema ilustra la naturaleza de los sistemas metabólicos, que permanecen cerrados a causas eficientes, y se resuelve así el problema de la continua degradación de los catalizadores.

Como se muestra en la figura, un sistema (M, R) con organización constante presenta una lógica circular, propia del metabolismo, en el sentido de que todas las causas eficientes de los procesos residen en elementos de la misma red. En otras palabras, las diversas transformaciones que suceden quedan catalizadas por productos del sistema que ellas mismas forman. Esto es a lo que Rosen se refería con el término *cierre metabólico*. En este sentido, conviene no confundir el cierre a causas eficientes con el cierre a causas materiales: Los organismos no necesitan catalizadores externos que les supervisen; ahora bien, como ya se explicó anteriormente, la bioenergética requiere que sean termodinámicamente abiertos (ver de nuevo (Cornish-Bowden et al., 2007)). Este es el motivo por el que una representación como la de la Figura 1.5, en la cual una rueda de molino gira indefinidamente gracias a una completa y continua regeneración – sin aporte alguno de energía externa – del agua que sirve para moverla, no sería una metáfora adecuada para el funcionamiento de los seres vivos⁴. Rosen entendió correctamente que los sistemas metabólicos son abiertos a causas materiales: necesitan moléculas disponibles en el entorno para sus funciones internas. La organización debe mantenerse constante a pesar del continuo cambio de los componentes moleculares que la realizan.

Rosen propuso analizar los sistemas (M, R) y explicar la naturaleza del cierre metabólico en términos puramente formales, con un lenguaje matemático abstracto que resulta muy críptico para la mayoría de los biólogos y bioquímicos. Se valió de la teoría de categorías para interpretar las enzimas como operadores lógicos entre conjuntos de variables. Siguiendo esta estrategia, representó algebraicamente las relaciones entre los elementos que actúan de modo sinérgico en un sistema (M, R) con organización constante: $f(a) = b$; $\Phi(b) = f$; $\beta(f) = \Phi$. De esta manera, el cierre metabólico puede representarse como $\beta(f) = \Phi$. En el resultado final de Rosen, aparece como requisito fundamental que el operador f sea invertible (Letelier et al., 2005). Esta propiedad particular sugiere que el cierre metabólico sólo es posible para ciertas funciones que resuelvan la ecuación $f(f) = f$. Esto en matemáticas sólo sucede en casos muy puntuales y ha sido fruto de algunas críticas (Landauer y Bellman, 2002). No obstante, algo que también resulta relevante es el

⁴ En verdad, un organismo podría ser cerrado a causas materiales en un hipotético caso extremo de perfecto reciclaje de sus recursos materiales (King, 1982), si bien siempre requeriría un acoplamiento con una fuente de energía externa para su continuo funcionamiento, y por tanto ser termodinámicamente abierto.

hecho de que para que exista β se haya de cumplir $\Phi(b) = f$, y por tanto que Φ deba tener una y sólo una solución. Precisamente la capacidad para invertir un operador sugiere relaciones uno-uno, en las cuales el valor de cada elemento del sistema queda determinado conociendo sólo el de uno de ellos, lo cual resulta muy atractivo para explicar cómo un sistema autoorganizado codifica la “información” sobre el estado y la reparación de los catalizadores en su propia red.

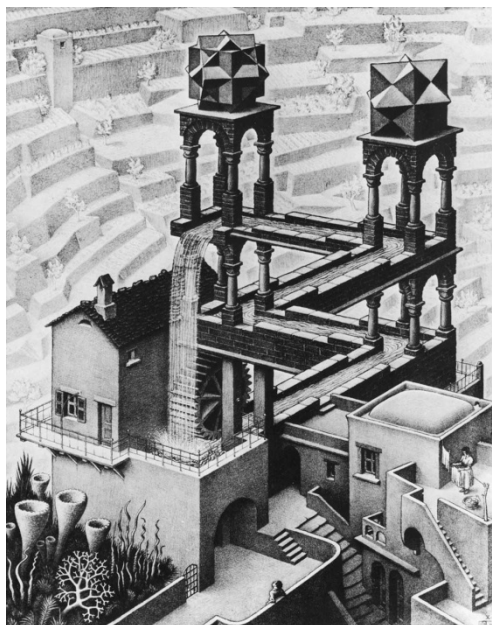


Figura 1.5 Imagen de una litografía surrealista de M. C. Escher (1961), metáfora de un sistema alejado del equilibrio que viola los principios de la termodinámica. La cascada (homónimo del título de la obra) puede simbolizar el consumo de precursores ricos en energía necesarios para el funcionamiento del metabolismo (rueda de molino). El agua en el dibujo sigue un circuito cerrado en el que se renueva continuamente la energía potencial necesaria para mover la rueda de molino sin intercambio alguno de energía con el entorno, lo cual es imposible atendiendo al segundo principio de la termodinámica. En la realidad, obviamente, los productos no pueden ser reciclados y regenerar de nuevo los precursores activos si no es por un acoplamiento con una fuente externa de energía (por ejemplo, radiación ultravioleta).

Desgraciadamente, la obra de Rosen no trasciende más allá del lenguaje de abstracción matemática y no recoge ningún ejemplo concreto que permita relacionar su teoría con el mundo de la química, y situarla en el contexto real del metabolismo y la naturaleza de los catalizadores. Sin embargo, en los últimos años el grupo de Cornish-Bowden y Cárdenas, en colaboración con el grupo de Letelier, ha realizado un encomiable esfuerzo por analizar el trabajo de Rosen y expresarlo en un lenguaje más comprensible, como queda reflejado en (Letelier et al., 2006). Además, a lo largo de una serie de trabajos posteriores ((Cornish-Bowden y Cárdenas, 2007; Cornish-Bowden et al., 2007) entre otros), estos autores han aportado varios ejemplos con los que se ilustra el aspecto de un sistema (M,R) y su importancia para comprender el mantenimiento del metabolismo (Figura 1.6)⁵. También se discuten algunos otros aspectos, como la necesidad del mantenimiento de la identidad en los sistemas (M,R) para su consolidación en el origen de la vida (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2008).

⁵ Anteriormente, otros autores ya realizaron una revisión de la teoría de Rosen (Casti, 1988; Wolkenhauer, 2001), pero en cierta medida con un interés muy distinto, más bien puesto en las aplicaciones del formalismo y la lógica causal, relacional, a problemas de ingeniería de control, o a su posible utilidad como base conceptual para resolver problemas de bioinformática.

Con el fin de expresar del modo más simple posible la idea de sistema (M,R) , los autores anteriores han planteado un modelo teórico de sistema (M,R) a través de un esquema sencillo de tres reacciones catalíticas interrelacionadas (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2007) (Figura 1.6B).

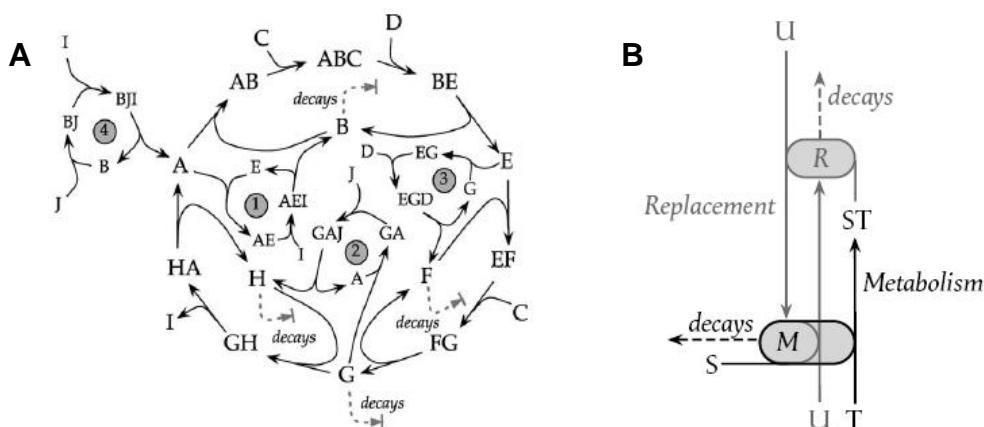


Figura 1.6 Esquema de dos modelos teóricos de sistema (M,R) extraídos de (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2007). Los procesos de degradación se indican con flechas discontinuas. (A) Modelo de un sistema (M,R) elaborado sobre la base del esquema de reacciones del ciclo de la urea, el cual aquí cumple la función metabólica. (B) Modelo de un sistema (M,R) sencillo. El metabolismo (en negro) se representa de modo resumido por la acción de un catalizador M que cataliza la formación de una molécula ST a partir de dos precursores externos S y T . El modelo contempla la degradación del catalizador M así como el proceso de reemplazo por acción de un segundo catalizador R actuando sobre ST y otro precursor externo U . El catalizador R a su vez sufre degradación, pero es repuesto por una actividad secundaria de M actuando sobre U como sustrato alternativo a T , para así completar el cierre metabólico. Ambos módulos de reemplazo se muestran en gris.

El modelo ilustrado en la Figura 1.6B, recoge las características esenciales de un sistema (M,R) , ya que combina procesos metabólicos así como los procesos de reemplazo catalítico que consiguen completar el cierre metabólico: Existe en dicho modelo una actividad metabólica representada por una reacción que transforma los precursores S y T en ST gracias al catalizador representado como M . Dicho catalizador inevitablemente sufre degradación y requiere ser reemplazado para operar indefinidamente, para lo cual se incluye la acción de un segundo catalizador R que consume ST y un tercer precursor U para regenerar M . Pero, de nuevo, R es susceptible de degradarse y requiere ser repuesto por otro catalizador. Para evitar una obvia regresión al infinito, la reposición de R recae en una actividad catalítica secundaria de M , que actúa sobre U en vez de sobre T ; en esta ocasión se consume S y U para recuperar el catalizador R y conseguir así completar el cierre metabólico. En suma, se trata de un sistema cerrado a causas eficientes: Se observa que todos los catalizadores involucrados en la red de reacciones son producto a su vez de este conjunto de reacciones que caracterizan el sistema y que ellos catalizan. A su vez, cualquiera de las reacciones está catalizada por un producto del propio sistema.

Por último, en relación con la capacidad de un sistema metabólicamente cerrado para codificar información sobre su funcionamiento distribuida en la propia red, es interesante reparar en que una vez establecido el cierre, la naturaleza de todos los catalizadores puede ser desvelada gracias a los detalles moleculares de los procesos que los reponen. En el modelo anterior, el catalizador M , involucrado en el proceso metabólico y en el de reemplazo de la reparación, es producido por la unión de ST y U y puede atribuírsele naturaleza de STU . Y a su vez, el catalizador R , repuesto a través de la unión de S y U , presenta naturaleza de SU . Esta observación contribuye a reducir la fuerte dicotomía que habitualmente se establece entre *metabolitos* y *enzimas* (lo cual es interesante en el contexto del origen de la vida), y permite

expresar el modelo de una forma más explícita, como se recoge en (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2007) y tendremos ocasión de explicar en el preámbulo a los primeros resultados de este trabajo de investigación.

1.2.5 Teoría de la autopoiesis

Al igual que la teoría de los sistemas (M,R) , la teoría de la autopoiesis, propuesta por Maturana y Varela (1973; 1980), también explica la vida desde un nivel fundamental, una organización básica común basada en la capacidad autoconstructiva del metabolismo en su conjunto. Las principales diferencias entre ambas teorías surgen de un planteamiento radicalmente distinto a la hora de enfocar el estudio del cierre organizativo del metabolismo de los seres vivos. Rosen abordó el problema desde un formalismo matemático-categorial, llegando a una caracterización lógica de la organización. En cambio, en la autopoiesis, el mayor esfuerzo consiste en caracterizar la organización topológica de los sistemas vivos.

Maturana y Varela definieron el tipo de organización que caracteriza a lo vivo como una red de producción de componentes que generan y participan recursivamente en la misma red que los produce y al mismo tiempo permiten que la red sea una entidad en el espacio en que esos componentes existen. A esta organización la denominaron *autopoiesis* (del griego *auto*, “sí mismo”, y *poiesis*, “producción”) y al conjunto de sistemas que exhiben una organización autopoietica, *sistemas autopoieticos* (Varela et al., 1974), ya que son capaces de producirse a sí mismos: El producto de su operación es el sistema en sí mismo, es decir, la realización de la propia organización autopoietica. Los autores distinguieron así este tipo de sistemas de los denominados *alopoieticos* o *heteropoieticos*, cuya realización como unidad está determinada por procesos que no residen en su propia organización y que son distintos a los que definen su operación. En la Figura 1.7 se recoge esquemáticamente las principales características de la organización autopoietica.

La fenomenología que resulta de una organización autopoietica es el automantenimiento del sistema considerado como entidad, que Maturana y Varela denominaron *autonomía* (ver de nuevo (Varela et al., 1974)). La autopoiesis opera perpetuando su propia organización autopoietica. Por tanto, la organización permanece como entidad a través de la constante realización de su autopoiesis, mientras no se destruya la red de procesos que la hace precisamente autopoietica. Por ejemplo, una célula permanece como tal sólo en la medida en la que se realiza continuamente la organización que la define, ante el permanente recambio de materia y a pesar de cambios en la forma y especificidad de sus reacciones constitutivas. En cualquier caso, su entidad no viene dada por la relación espacial de sus componentes, sino por la dinámica de sus interacciones.

Según la teoría de la autopoiesis, todos los sistemas vivos pertenecen a la clase definida como sistemas autopoieticos (Varela et al., 1974). En el contexto de una célula viva, los productos del metabolismo, a través de sus interacciones generan y participan recursivamente en la misma red metabólica de reacciones que los produce y a su vez constituyen la célula como una entidad material. Es decir, cualquier célula viva debe contar con una serie de procesos metabólicos automantenidos contenidos en su interior y debe estar separada del entorno por una frontera física o membrana que permita el metabolismo y de la cual es responsable el propio metabolismo. Lógicamente, es la propia célula la que responde al funcionamiento del metabolismo y a la producción de la membrana, ya que estas funciones no pueden recaer en una entidad externa. De esta manera, la célula es la causa eficiente de ella misma, pudiéndose hablar de una organización circular o cerrada.

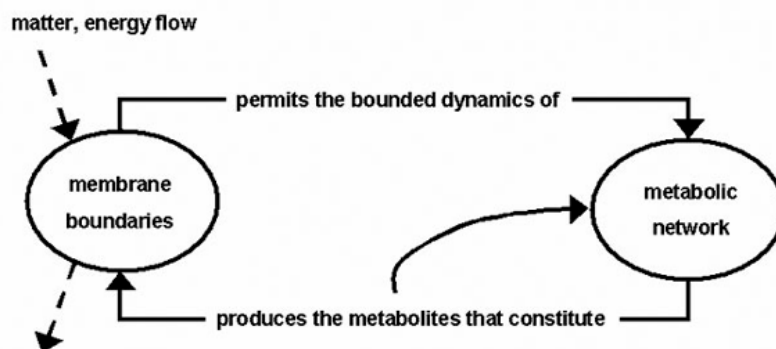


Figura 1.7 Esquema extraído de (Rudrauf et al., 2003) que describe la circularidad de la organización autopoietica. La organización autopoietica se define como entidad autónoma a través de una serie de procesos (reacciones químicas) de producción de componentes, tanto metabólicos como de membrana, que participan de modo recursivo en la misma red que los genera, así como en la construcción de una membrana limitante que permite a la red tener una entidad en el espacio en que sus componentes existen. La estructura permanece abierta a un flujo de entrada y salida de materia y energía del sistema.

Algo que podría resultar más comprometido es afirmar que todos los sistemas autopoieticos son sistemas vivos. Esta cuestión fue rápidamente resuelta por Maturana y Varela argumentando que para que un sistema tenga la fenomenología de un ser vivo, basta con que su organización sea autopoietica (ver el último trabajo citado). Por tanto, concluyeron que la autopoiesis es el tipo de organización que caracteriza al ser vivo y a la vez determina que pueda ser tratado como vivo. Es decir, la autopoiesis es condición necesaria y suficiente para explicar la organización de lo vivo: un sistema que es autopoietico también es vivo.

De nuevo, al igual que otros autores (Rosen muy en particular), sostuvieron que la capacidad de reproducción y evolución no son características *constitutivas* de la organización de los sistemas vivos. Para Maturana y Varela, la existencia de esta fenomenología requiere de una organización autopoietica previa: Para que pueda ocurrir la reproducción, es lógicamente necesario el establecimiento de una entidad que reproducir. Además, una cierta entidad debe ser la que opere para que la reproducción se produzca, y por tanto debe ser predecesora. Por último, la capacidad reproductiva y la capacidad de evolución son únicamente propiedades de alguno de los componentes del sistema, pero no pueden caracterizar constitutivamente al sistema en su conjunto. Maturana y Varela insistieron en que la organización de un sistema está constituida por el conjunto de relaciones o interacciones entre sus componentes, que es precisamente lo que define al sistema como entidad (Varela et al., 1974). Siguiendo este razonamiento, concluyeron que la organización de lo vivo debe explicar al sistema vivo como un todo, como una entidad autónoma que está viva, independientemente de que se reproduzca o no. Es decir, la organización de lo vivo sólo puede ser caracterizada sin ambigüedad especificando la red de interacciones de los componentes que lo constituyen.

En los sistemas vivos, la reproducción se explica como un modo particular de realización de la autopoiesis en el cual el propio proceso de reproducción está incluido en la organización autopoietica. De esta manera, las nuevas entidades celulares generadas surgen por la realización de la autopoiesis de la entidad madre y a su vez heredan la misma organización autopoietica reproducible (distribución de autopoiesis en células hijas). Esta auto-reproducción de la autopoiesis es un prerequisite para la evolución, según Maturana y Varela.

Siguiendo esta teoría, para entender el origen de la vida, es crucial explicar cómo puede surgir un sistema autopoietico. Aunque Maturana y Varela no consideraron el problema del origen

explícitamente (su modelo trataba de reflejar la esencia de lo vivo), se puede interpretar que un sistema autopoietico pudo aparecer espontáneamente a través de la interacción de componentes independientes cuyas relaciones de transformación molecular constituyeran una red de producción espacialmente contigua que se manifestara como una entidad en el espacio de sus elementos (ver el trabajo anteriormente citado). Así, frente a otros modelos de metabolismo mínimo, la teoría de la autopoiesis enfatiza la organización topológica de los organismos y, en particular, la importancia de la compartimentación para definir los límites de la entidad del sistema vivo.

No obstante, la teoría de la autopoiesis peca de excesiva abstracción, como han puesto en evidencia diversos trabajos posteriores (Fleischaker, 1988; 1990; Ruiz-Mirazo y Moreno, 2004), los cuales recalcan las implicaciones físico-químicas que llevaría consigo la implementación de un sistema de dichas características. En este sentido, se puede realizar una crítica similar a la que se hiciera anteriormente al Chemotón, puesto que no investiga realmente las condiciones específicas que un compartimento biológico debe cumplir para ser funcional en la práctica. Por tanto, si se pretende evaluar la trascendencia de esta teoría a la hora de explicar el origen de la vida (Ruiz-Mirazo y Moreno, 2004), en verdad se hace imprescindible encarar el problema de la génesis del compartimento en condiciones prebióticas realistas; un compartimento que siendo generado por la dinámica de las reacciones de producción que él mismo encierra, al mismo tiempo asegure las condiciones físico-químicas para que ocurran esas dinámicas.

1.3 Organización y origen de la vida

Llegados a este punto, es lógico preguntarse en qué medida las teorías anteriormente expuestas sobre la organización básica de lo vivo arrojan luz sobre el origen y primeras etapas de desarrollo de la vida. En primer lugar, es inevitable en este contexto reparar en algunas diferencias notorias entre las diversas teorías: Las tres primeras (la de los conjuntos autocatalíticos, la del hiperciclo y la del Chemotón) revelan de manera más o menos explícita la naturaleza de los componentes involucrados en la organización que proponen, lo cual lleva a relacionarlas con escenarios de evolución prebiótica bien distintos, si bien todas ellas mantienen en común la preocupación por la autorreplicación y un incesante anhelo por conseguir manifestar las capacidades de selección y evolución. Esto puede resultar un inconveniente, al menos a la hora de explicar las primeras fases del origen de la vida, gobernadas seguramente por relaciones entre moléculas sencillas carentes todavía de suficiente complejidad. Por ello, a pesar de ser una cuestión fuertemente debatida, en esta Tesis se estima que es importante que la organización básica que se proponga, con capacidad para dar explicación a tales fases tempranas, quede en principio desvinculada de las ideas de selección y evolución.

Las dos últimas teorías (la de los sistemas (M,R) y la de la autopoiesis) proporcionan una descripción de la organización de carácter más fundamental, y ofrecen modelos que han sido diseñados siguiendo un razonamiento eminentemente lógico. Las similitudes entre ambas han permitido de hecho que algunos autores se hayan aventurado a analizar sus puntos en común y su grado de solapamiento (Letelier et al., 2003). No obstante, la comparación entre teorías resulta ciertamente delicada al haber seguido cada una un planteamiento tan distinto, y no será el objeto de este trabajo – aunque puede afirmarse que la teoría de los sistemas (M,R) es más explícita que la autopoiesis en cuanto a las relaciones lógicas que deben cumplirse para la consecución del cierre metabólico. En todo caso, el principal problema al que nos enfrentamos para poder estudiar el origen de la vida desde un enfoque organizativo es que, en general, todas las teorías anteriores, bien implican estructuras moleculares excesivamente complejas (en particular, biopolímeros), o resultan excesivamente abstractas para poder ser relacionadas y contrastadas con modelos

mínimos realistas, definidos en un marco físico-químico adecuado para un análisis experimental o computacional que permita valorar su validez o relevancia prebiótica. En definitiva, se hace patente la necesidad de compaginar los requerimientos conceptuales y teóricos de una organización cerrada, con modelos químicos sencillos factibles en condiciones prebióticas, que puedan servir así como guía para ahondar en el estudio de las organizaciones prebióticas y las primeras transiciones que hubieran de darse más allá de la autoorganización, en el camino hacia la vida.

Por su parte, la mayoría de las aproximaciones experimentales y computacionales al problema de las organizaciones prebióticas han preferido adoptar una idea más relajada del cierre organizativo, centrando fundamentalmente la atención en satisfacer las necesidades de una cinética basada en la *autocatálisis* o *autorreplicación*, una cinética de crecimiento. Por ejemplo, se han desarrollado sistemas autorreplicativos no enzimáticos a partir de ácidos nucleicos activados, basándose en reacciones de condensación catalizadas o dirigidas por molde (Sievers y Von Kiedrowski, 1994). Paul y Joyce (2002) han diseñado una molécula de RNA ligasa con capacidad para catalizar la unión de dos fragmentos de RNA específicos que producen otra copia de ella misma. Este proceso de autocatálisis directa resulta bastante ineficiente por la cantidad de reacciones cruzadas, pero estas limitaciones han sido superadas recientemente con un nuevo sistema altamente refinado por evolución *in vitro* que combina dos ribozimas ligasas semicomplementarias, en el cual cada una cataliza la síntesis de la otra a partir de dos oligonucleótidos (autocatálisis reflexiva) (Lincoln y Joyce, 2009). Este trabajo se acompaña además de un interesante análisis evolutivo sobre la eficiencia de crecimiento catalítico en presencia de mutantes, la variabilidad del sistema y el proceso de selección. Esta línea de investigación continúa dando frutos de relevancia al extenderse a redes más amplias y complejas (Vaidya et al., 2012).

Siguiendo principios parecidos, otros autores han explorado las posibilidades de autocatálisis y catálisis cruzada con otro tipo de componentes, como péptidos afines, haciendo uso de reacciones de condensación de fragmentos de los mismos dirigidas por molde (Lee et al., 1996). En este caso, aunque también la catálisis es dependiente de secuencia, el mecanismo de emparejamiento consiste en la estabilización estructural de un complejo ternario o cuaternario de hélices alfa superenrolladas (*coiled-coils*, en inglés), lo cual hace que el emparejamiento, y por tanto la catálisis, sea relativamente inespecífico. En todo caso, con este tipo de sistemas se observa la emergencia de sistemas autocatalíticos de péptidos que recuerdan a la organización hipercíclica. Así, las redes autorreplicativas de péptidos se configuran como alternativa a las redes autorreplicativas de RNA. Además, el grupo de Ghadiri, apostando por un planteamiento fuertemente sistémico, ha conseguido dar un paso más y caracterizar, a partir de una batería de péptidos diferentes, las posibilidades que ofrece la red de interacciones catalíticas entre ellos, e identificar algunos principios autoorganizativos que surgen (Ashkenasy et al., 2004). Por desgracia, aunque interesantes en relación con el origen de las capacidades evolutivas, tanto las aproximaciones con polinucleótidos como con polipéptidos presentan, para el problema que aquí nos ocupa, el inconveniente de involucrar moléculas relativamente complejas, difícilmente disponibles en los primeros escenarios de química prebiótica.

Dado que el reconocimiento molecular juega un papel importante en el favorecimiento de la autocatálisis, también se han desarrollado, inspirándose en las fuerzas intermoleculares débiles de unión de las cadenas de ácidos nucleicos, compuestos orgánicos sintéticos autocomplementarios, pero de naturaleza abiótica. Esto ha permitido diseñar sistemas autorreplicativos con componentes mucho más sencillos que los biopolímeros habituales (Rebek, 1992; Kamioka et al., 2010) y, de hecho, han sido sugeridos como posibles sistemas predecesores de un hipotético mundo RNA. Aun con todo, se trata todavía de moléculas muy complejas.

Seguramente, más elemental y revelador para la comprensión de los primeros fenómenos de autoorganización prebiótica haya podido ser la identificación de *ciclos metabólicos autocatalíticos*, ciclos de varias reacciones metabólicas que, por su estequiometría, propician que en cada vuelta de ciclo se multiplique la cantidad de todos sus intermediarios. Este es el caso del ciclo de la formosa (Butlerow, 1961). Se trata de un ciclo que puede operar catalizado por iones metálicos y que se compone de metabolitos muy simples, tales como el glicolaldehído y otros monosacáridos. El ciclo incorpora formaldehído, que es utilizado para la replicación de los intermediarios (con cada vuelta de ciclo, dos moléculas de glicolaldehído se forman por cada molécula presente inicialmente). Idealmente por tanto, podría esperarse una cinética de crecimiento autocatalítico, si bien en su implementación en el laboratorio se ha comprobado que es muy ineficiente (Szathmáry et al., 2005): presenta grandes problemas de especificidad y da lugar a múltiples reacciones cruzadas.

Por su parte, el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos (es decir, el ciclo de Krebs operando en sentido inverso), utilizado por ciertas especies de bacterias y arqueobacterias para fijar carbono, también presenta una estequiometría autocatalítica, y ha sido considerado por algunos como una reliquia de lo que podría haber sido el primer protometabolismo (Wächtershäuser, 1990). Wächtershäuser conjetura un origen de la vida quimioautotrófico, en el cual un ciclo de los ácidos tricarboxílicos reductivo arcaico, desprovisto de enzimas, en el que la fuente de poder reductor para la fijación de carbono proviniera de la formación oxidativa de piritita, habría sido la base primigenia para el desarrollo posterior de las demás rutas metabólicas. Todavía no ha sido posible reproducir experimentalmente este ciclo autocatalítico sin recurrir a reglas “poco ortodoxas” para el contexto prebiótico. Pero en todo caso, los avances que se produzcan con ciclos metabólicos autocatalíticos pueden ayudar mucho a comprender mejor qué requerimientos son necesarios para lograr el cierre metabólico, así como qué aspecto puede tomar y cómo pudo emerger un metabolismo automantenido primordial.

También resulta interesante y original la propuesta de un mundo prebiótico gobernado por agregados lipídicos en competición, con capacidad para catalizar el reclutamiento de una variedad de componentes anfifílicos/surfactantes, crecer y potencialmente reproducirse (Segré et al., 2001). El modelo GARD (del inglés *graded autocatalysis replication domain*) (Segré et al., 1998) describe de manera cuantitativa cómo a partir de poblaciones de agregados micelares de composiciones muy heterogéneas (en los cuales cada especie lipídica promueve con cierta intensidad la incorporación de otras), emergen redes lipídicas de catálisis mutua (autocatálisis reflexiva) y se seleccionan micelas de ciertas composiciones. Los autores proponen así un sistema prebiótico relativamente plausible, capaz de evolucionar por selección natural sin necesidad de mecanismos de replicación dependiente de molde, introduciendo la idea de una “*herencia composicional*” (Segré y Lancet, 2000). En verdad, estudios recientes (Vasas et al., 2010; 2012) demuestran que la capacidad de evolución en este tipo de sistemas es muy reducida: las soluciones finales de composición están limitadas a unos pocos atractores dinámicos, dictados por la matriz de catálisis entre especies lipídicas (matriz β), los cuales no responden a cambios de presión selectiva. A su vez, el modelo no se acompaña de evidencias experimentales, salvo las que existen tras algunos de los componentes de la citada matriz β . No obstante, el modelo GARD sí añade – tal vez sin pretenderlo – un elemento muy importante respecto a todos los modelos autocatalíticos anteriormente descritos, y es la idea de un compartimento, un dominio físico que define el espacio en el que se desarrolla la red de reacciones y que posibilita tratar al sistema (a cada agregado) como una entidad claramente diferenciada de su entorno.

La importancia del compartimento en el estudio de sistemas prebióticos y del origen de la organización biológica ya había sido reclamada por otros muchos científicos previamente (Oparin,

1961; Dyson, 1982; Morowitz, 1992; Deamer, 1997), y muy especialmente por la escuela de Luisi. Luisi y colaboradores abordan la cuestión de la autoproducción desde un nivel muy elemental, manteniendo siempre como referencia los requerimientos conceptuales para el cierre topológico-organizativo. Uno de sus mayores esfuerzos, de hecho, se centra en la implementación *in vitro* de un sistema celular autopoietico mínimo con capacidad de multiplicación. A través de una serie de contribuciones (Bachmann et al., 1992; Walde et al., 1994a), estos autores demuestran que agregados lipídicos – tanto micelares como vesiculares – pueden autorreproducirse en ciertas condiciones experimentales: La adición de etilcaprilato sobre una solución acuosa alcalina provoca una lenta reacción de hidrólisis que genera caprilato. Las moléculas de caprilato se ensamblan espontáneamente formando micelas, estructuras que adsorben rápidamente etilcaprilato del medio y favorecen su hidrólisis, promoviendo así su propio crecimiento en tamaño y número – un proceso típico de autocatálisis (Bachmann et al., 1992). De forma semejante, en condiciones de pH más neutras, la hidrólisis de un anhídrido graso (por ejemplo, anhídrido oleico) genera ácido graso que se autoensambla en bicapas, formando vesículas. Las vesículas (de ácido oleico/oleato) así generadas catalizan, dentro de su entorno local, la hidrólisis del precursor anhídrido, favoreciendo su propio aumento en tamaño y número⁶ (Walde et al., 1994a) (Figura 1.8). Puesto que tanto en un caso como en el otro el proceso tiene lugar y está causado por los propios agregados, según los autores puede hablarse de *autorreproducción* en sentido autopoietico (Luisi, 2003).

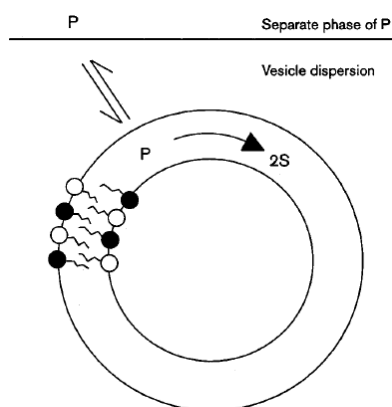


Figura 1.8 Representación esquemática de la autocatálisis en un agregado vesicular. El precursor P, un anhídrido graso, es rápidamente adsorbido por la bicapa, la cual, a su vez, favorece su hidrólisis. En la reacción se generan dos moléculas de surfactante S que contribuyen al crecimiento de la vesícula. El surfactante en la bicapa se presenta tanto en su forma de ácido graso protonado como de jabón (cabeza polar negra y blanca, respectivamente).

Los experimentos anteriores del grupo de Luisi son de gran relevancia, ya que demuestran la importancia que puede tener el compartimento como algo más que una barrera biológica o un mero contenedor de reacciones, de acuerdo a lo que ya apuntaba la teoría de la autopoiesis,

⁶ Obviamente, no se trata de una catálisis química convencional. El mecanismo de catálisis probablemente consista en el aumento de la superficie de interfaz fase acuosa – fase hidrofóbica que provocan los agregados lipídicos, tanto las micelas como las vesículas, y que permite aumentar la solubilidad del precursor. En lo que se refiere al proceso de crecimiento y multiplicación, debe señalarse que aunque globalmente se observa que las vesículas aumentan tanto en tamaño como en número, todavía no se conoce del todo bien el mecanismo de reproducción, por ejemplo en qué medida y en qué circunstancias la producción de surfactante conduce al crecimiento de vesículas preexistentes, cuándo a la formación *de novo* de vesículas, cuándo desencadena fenómenos de división, etc. No obstante, estudios cinéticos y microscópicos posteriores al trabajo original de Walde et al (1994a) han permitido ciertos avances importantes en algunas de estas cuestiones (Blöchliger et al., 1998; Berclaz et al., 2001; Chen y Szostak, 2004a; Stano et al., 2006; Stano y Luisi, 2010).

anticipando las enormes posibilidades dinámicas que pudo ofrecer un compartimento prebiótico basado en el ensamblaje espontáneo de lípidos. Al mismo tiempo, son experimentos en los que se entrelazan procesos de reacción química con fenómenos físicos de autoensamblaje. Esta interesante combinación abre la puerta a la exploración de nuevos fenómenos de autoorganización y comportamiento complejo en escenarios de química coloidal, típicamente no homogéneos, en los que la coexistencia y segregación de dominios acuosos e hidrofóbicos ofrece una riqueza adicional (respecto a la química tradicional en fase acuosa) y puede favorecer nuevas interacciones y procesos dinámicos aún poco estudiados⁷. Luisi y sus seguidores consideran en todo caso este tipo de agregados sencillos (más concretamente, las vesículas formadas por ácidos grasos) como posibles sistemas prebióticos autorreproductivos predecesores de las primeras células, otorgando así al compartimento un papel destacado en el origen de la vida (Luisi et al., 1999).

No obstante, desde el punto de vista organizativo, estas estructuras macromoleculares autocatalíticas están muy en el límite de lo que podrían considerarse organizaciones cerradas autopoieticas, entre otros aspectos porque los agregados lipídicos permanecen como estructuras en equilibrio o quasiequilibrio con los monómeros de surfactante presentes en el entorno, y la demarcación entre lo que constituye la entidad y su entorno no resulta tan evidente. Además, el metabolismo está muy débilmente representado, al suceder tan sólo una única reacción – y en todo caso más bien en la periferia del sistema. Claramente, para la consecución de un modelo completo de célula mínima primitiva, no es suficiente con la autorreproducción del compartimento, sino que es necesaria además una organización metabólica interna autosuficiente, acoplada con el proceso de construcción de la membrana. Y esto es algo de lo que el propio Luisi y colaboradores ya eran conscientes.

Precisamente, como aproximación para afrontar el nuevo reto pendiente, la escuela de Luisi realiza, poco después de los trabajos originales con agregados autorreplicativos, un trabajo pionero que combina la autorreplicación del compartimento con un proceso interno de síntesis de un biopolímero ocurriendo simultáneamente (Walde et al., 1994b). Una vez que establecen que las vesículas de ácido oleico/oleato son capaces de mantener encapsulada una enzima polinucleótidosforilasa (PNPasa) en su forma estable, y que son permeables a mononucleótidos, los autores demuestran, tras la adición al medio externo de ADP y anhídrido oleico, un progreso tanto en el crecimiento del compartimento vesicular como en la polimerización o síntesis interna del polinucleótido poli(A). Nuevamente, varias cuestiones afloran: Por supuesto, aunque los dos procesos de síntesis ocurren simultáneamente, son independientes, es decir, la reproducción vesicular no está acoplada, no depende del aumento de RNA⁸. Por otro lado, la reacción interna de polimerización recae en una enzima exógena, una macromolécula biológica (inverosímil en condiciones prebióticas). Y este asunto está estrechamente ligado con una última idea, que cobrará especial importancia en el curso de este trabajo: el proceso de polimerización sigue una lógica eminentemente lineal⁹; en otras palabras, falta la recursividad necesaria en una organización

⁷ Como ejemplo de algunas aportaciones interesantes que ya se han producido en esta línea, cabe mencionar la generación de patrones oscilatorios espacio-temporales químicos en microemulsiones reversas (de agua en aceite) (Epstein y Vanag, 2005), o la formación de gotas lipídicas móviles “autopropulsadas” por reacciones químicas que suceden en su interfaz con el agua (Hanczyc et al., 2007).

⁸ Al mismo tiempo, se desconoce el mecanismo de reproducción vesicular, de forma que se ignora si la enzima se redistribuye o no en las nuevas vesículas formadas, preservando – o no – la reacción en éstas.

⁹ Los autores describen que tras un cierto lapso de tiempo inicial, existe una cierta autocatálisis, ya que se generan oligómeros que actúan como cebadores, favoreciendo algo el progreso de la polimerización. De todas formas, el proceso, fundamentalmente instruido por la PNPasa, sigue estando muy alejado de los requerimientos conceptuales que se reclaman para el cierre organizativo.

metabólica para poder considerar al sistema mínimamente autónomo – y en definitiva plausible como modelo de sistema protocelular realista.

En todo caso, sí conviene reparar en el gran acierto de los experimentos de Luisi, ya no sólo en cuanto a la concepción del compartimento como una estructura dinámica activa en la organización prebiótica, sino además en cuanto a la elección de la clase de lípidos que lo integran: ácidos grasos, que son de naturaleza más sencilla que los fosfolípidos, y confieren mayor dinamismo a la membrana. En verdad, tales experimentos no habrían podido ser realizados con éxito de no ser por el tremendo avance que se ha producido en las tecnologías de liposomas en las últimas décadas, pero más concretamente, de no ser por el desarrollo de toda una teoría sobre membranas prebióticas basadas en ácidos grasos, cuyo mayor artífice ha sido Deamer (1997). Hasta hace unos años, la mayoría de teorías sobre el origen de la vida consideraban la compartimentación como un fenómeno relativamente tardío, por los serios inconvenientes que planteaba: las membranas de fosfolípidos suponen una fuerte barrera al libre acceso de nutrientes en ausencia de complejos proteicos transportadores, y a su vez, los fosfolípidos comunes de las biomembranas actuales son moléculas demasiado complejas, cuya síntesis requiere de enzimas, y no pueden ser consideradas disponibles en condiciones prebióticas. Sin embargo, los lípidos de membrana debieron sufrir un largo proceso de evolución, tanto durante la etapa instruida por genes (Peretó et al., 2004), como durante fases precoces anteriores, en las cuales los ácidos grasos han sido propuestos como un punto de partida plausible (Monnard y Deamer, 2002)¹⁰. Se ha comprobado que estos compuestos son capaces de autoensamblar espontáneamente en vesículas (bicapas cerradas) (Gebicki y Hicks, 1973; Hargreaves y Deamer, 1978), y que éstas resultan bastante más permeables que los liposomas estándar de fosfolípidos (Deamer, 2008)¹¹. Además, su relevancia prebiótica queda respaldada por evidencias como su obtención en experimentos de simulación de síntesis prebiótica (McCollom et al., 1999), y su identificación como componentes de condritas carbonáceas, como el meteorito Murchison (Deamer, 1985).

Recientemente, el legado de Deamer y Luisi ha sido tomado por el grupo de Szostak, el cual está realizando un trabajo experimental muy destacado, con el fin de lograr sintetizar una (proto)célula mínima completa capaz de autorreplicarse. Más concretamente, el objetivo de Szostak es conseguir acoplar, en un sistema-modelo protocelular, la reproducción del compartimento con la replicación de una molécula “informativa” – tipo ácido nucleico – en su interior (Szostak et al., 2001). Este ambicioso proyecto ha supuesto ya, como punto de partida, un gran avance en cuanto al estudio de las propiedades biofísicas de las membranas basadas en ácidos grasos (ya sean vesículas formadas por ácidos grasos solos, o en combinación con otros compuestos anfifílicos sencillos), como refleja todo un repertorio de contribuciones: Szostak y seguidores han profundizado en la cinética y mecanismo de crecimiento vesicular (Chen y Szostak, 2004a; 2004b), en el mecanismo de reproducción (Hanczyc et al., 2003; Hanczyc y Szostak, 2004; Zhu y Szostak, 2009), han descrito fenómenos de competición entre vesículas (Chen et al., 2004; Budin y Szostak, 2011), y han disipado algunos problemas relativos a la permeabilidad y a la estabilidad que

¹⁰ Una propuesta alternativa considera la evolución de los lípidos de membrana a partir de isoprenoides simples (Ourisson y Nakatani, 1994).

¹¹ Al mismo tiempo, las vesículas formadas por ácidos grasos también resultan menos estables. Sólo se forman en una región de pH comprendida en valores cercanos al pK del ácido en la bicapa, que corresponde con aquellas situaciones en las que existe aproximadamente una mezcla equimolar del ácido en su forma protonada y ionizada. Entonces ambas formas (cónicas) se asocian por puentes de hidrógeno, generando dímeros cilíndricos que ayudan a estabilizar la bicapa. Se tratan por tanto de *vesículas de ácido graso/jabón*, aunque habitualmente se las denomina por simplicidad *vesículas de ácido graso*. Nótese que otros factores como la concentración de surfactante, la temperatura o la fuerza iónica influyen en su estabilidad (para una revisión, ver (Morigaki y Walde, 2007; Walde et al., 2006)).

planteaban este tipo de compartimentos (Sacerdote y Szostak, 2005; Mansy y Szostak, 2008). Con todo ello, la escuela de Szostak ha conseguido de momento la polimerización espontánea no enzimática de DNA dirigida por molde en el interior de vesículas basadas en ácidos grasos, por adición externa de los nucleótidos activados (Mansy et al., 2008); aunque es de esperar que no tarden en realizarse nuevos avances.

Sin embargo, frente a la línea de investigación de Szostak, encaminada hacia la implementación efectiva de *ribocélulas* (sistemas protocelulares que combinarían propiedades dinámicas del compartimento y del material genético), sigue quedando pendiente de abordar, tanto experimentalmente como computacionalmente, un escenario más fundamental si cabe: el de sistemas protocelulares en los cuales el compartimento quede acoplado con una red de reacciones protometabólicas interna, autoproductiva, siguiendo los principios de una organización circular. La concepción de este tipo de sistema combinado, que aúne los requerimientos conceptuales del cierre metabólico con el potencial que brinda la fusión de fenómenos de autoensamblaje y de autoorganización para el desarrollo de un nivel de complejidad química superior, puede resultar clave como punto de partida para comprender mejor el origen y organización de los sistemas vivos (Ruiz-Mirazo et al., 2013). Por ello, en este trabajo trataremos de construir paso a paso, *ab initio*, un modelo plausible de sistema protocelular automantenido, combinando las propiedades cinéticas y termodinámicas de un modelo teórico sencillo de protometabolismo, y las propiedades físicas de modelos *in vitro* de compartimento prebiótico. Una doble estrategia de análisis experimental y computacional nos permitirá ya no sólo evaluar la validez y relevancia del modelo en sus distintas fases de construcción, sino explorar su robustez dinámica y las posibles restricciones físico-químicas asociadas con diversos estadios tempranos de evolución protocelular.

Este trabajo de Tesis doctoral se ha dividido en varias secciones: Una vez se expongan los Objetivos, se dedicará un primer capítulo (Capítulo 3) al desarrollo del modelo protometabólico, así como al análisis computacional de sus propiedades estructurales y dinámicas siguiendo una metodología determinista. En el Capítulo 4 se aborda el estudio dinámico del modelo protometabólico mediante una metodología estocástica, más adecuada para el tipo de escenarios de volúmenes pequeños en los que pudo haberse desarrollado la química prebiótica. A continuación (Capítulo 5), el modelo protometabólico se amplía para incluir, de acuerdo con los requerimientos termodinámicos, los procesos no catalizados de síntesis. Se discute, tanto desde una perspectiva determinista como estocástica, el efecto que juegan estos procesos en la funcionalidad metabólica. El Capítulo 6 está dedicado al análisis *in vitro* de las propiedades físicas de diversos tipos de vesículas formadas por compuestos anfifílicos sencillos, consideradas como modelo de compartimento prebiótico. Será ya en los Capítulos 7 y 8 donde se integre la información recabada del modelo protometabólico y de los modelos vesiculares en un modelo semiempírico protocelular. Con él, se explorará mediante simulación las consecuencias cinéticas de la encapsulación del sistema protometabólico en un compartimento prebiótico, prestando especial atención al efecto de la difusión limitada de nutrientes sobre la actividad metabólica, a la estabilidad dinámica global del sistema protocelular, y a los requerimientos para una dinámica autorreproductiva. Tras estos capítulos de Resultados, en la Discusión se tratará la posible relevancia prebiótica del modelo, se considerarán las restricciones físico-químicas desde una perspectiva evolutiva, y se apuntarán algunas perspectivas futuras. Por último, el capítulo de Material y Métodos recoge las herramientas de trabajo que han sido clave para el abordaje semiempírico que se realiza a lo largo de esta investigación, y que constituye una de sus características más destacables, en un campo tradicionalmente dividido en enfoques teóricos, por un lado, y experimentales por otro.

Capítulo 2

2 Objetivos

El propósito principal de esta Tesis doctoral es la elaboración de un modelo cinético de sistema protocelular automantenido, prebióticamente plausible, que combine un compartimento y una red de reacciones químicas relativamente simples, pero con importantes elementos e implicaciones de carácter biológico. Dicho modelo se establecerá en virtud de una serie de requerimientos conceptuales y organizativos, y se contrastará tanto computacionalmente (*in silico*) como experimentalmente (*in vitro*) para discernir, en un marco físico-químico realista, los requisitos espacio-temporales para su correcto funcionamiento y desarrollo. De acuerdo con este planteamiento, se proponen los siguientes objetivos:

1. Estudio computacional de las propiedades estructurales y dinámicas de un modelo teórico sencillo de metabolismo (o *protometabolismo*): un sistema (M,R) , planteado como una red de reacciones químicas de carácter autoproductivo. Evaluación pormenorizada de los requerimientos cinéticos para su automantenimiento.
2. Análisis *in vitro* de las propiedades físicas de estabilidad y permeabilidad de vesículas constituidas por compuestos anfifílicos sencillos, empleadas como modelos de compartimentos primitivos. Estimación del efecto que diversos cambios en la composición lipídica de la membrana pudieran tener sobre la estabilidad de los compartimentos protocelulares y su permeabilidad a posibles nutrientes prebióticos.
3. Desarrollo de un modelo cinético semiempírico de protometabolismo encapsulado, que combine, de forma realista, las especificaciones cinéticas del modelo protometabólico con los atributos básicos (topológicos, estructurales y biofísicos) de los compartimentos vesiculares y con su dinámica intrínseca de autoensamblaje. Estudio del efecto restrictivo mutuo del metabolismo y la membrana, y determinación, mediante análisis dinámico computacional, de las limitaciones físico-químicas a la viabilidad del sistema global protocelular.
4. Exploración de las posibilidades dinámicas que ofrece el acoplamiento entre la red de reacciones y el compartimento a través de la inclusión en el modelo de un proceso interno de síntesis de lípido. Valoración del potencial del modelo para construir niveles crecientes de complejidad, tanto desde un punto de vista molecular como organizativo.

Capítulo 3

3 Un sistema (M,R) simple como posible modelo protometabólico

Con el fin de contribuir a la construcción de un esquema químico concreto plausible que contenga la idea de cierre metabólico propuesta por Rosen, y así evaluar la posible relevancia de este tipo de sistemas autoproductivos en el origen de la vida, se ha desarrollado un modelo cinético de sistema (M,R) sencillo, basándose en un modelo teórico anteriormente propuesto por otros autores (Morán et al., 1996; Letelier et al., 2006; Cornish-Bowden y Cárdenas, 2007) y que ha sido comentado en la Introducción (Figura 1.6B). La cuestión que se aborda en este capítulo, y que ha dado lugar a una publicación en la revista *PLoS Computational Biology* (Piedrafita et al., 2010) es: ¿qué peculiaridades estructurales y, sobre todo, dinámicas caracterizan a un sistema cerrado a causas eficientes? ¿Puede un sistema con estas características ser capaz de automantenerse? De ser así, ¿qué tipo de requerimientos cinéticos debieron de haber hecho falta para el desarrollo y funcionamiento de un sistema semejante en condiciones prebióticas?

3.1 Modelo cinético

El modelo original de Cornish-Bowden y colaboradores consta de tres reacciones catalizadas, cada una de las cuales simboliza uno de los procesos esenciales de *metabolismo* (M), *reemplazo* (R) y *cierre organizativo* (OI) previstos por Rosen, como se detalla a continuación:



Estos tres procesos se muestran aquí como reacciones químicas de un solo paso, catalizadas por las especies mostradas sobre las flechas. No obstante, cada uno de ellos se puede considerar convenientemente como un ciclo de reacciones elementales que involucran al catalizador con los diversos sustratos, si se incluye explícitamente a los catalizadores en las reacciones en que

participan¹². Por ejemplo STU, STUS, STUST serían distintos intermediarios del proceso M. De esta manera el sistema queda descrito por el conjunto de reacciones esquematizadas en la Figura 3.1.

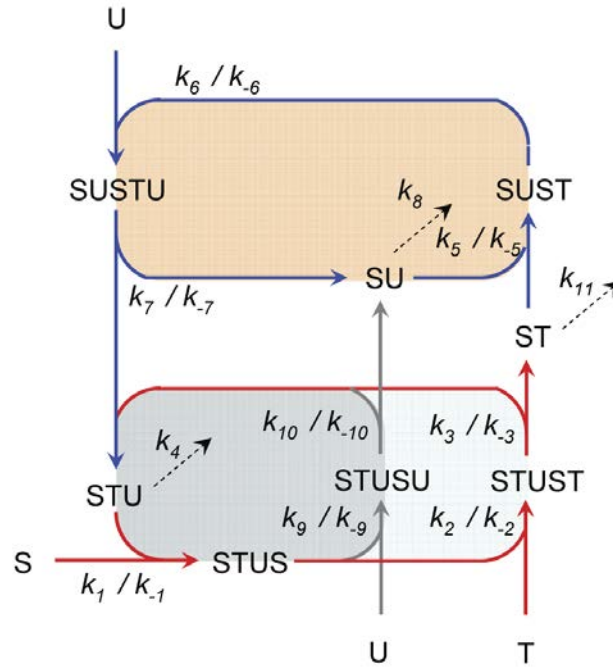


Figura 3.1 Modelo cinético de un sistema (M,R) sencillo. El modelo está formado por tres ciclos catalíticos interrelacionados (en distintos colores), organizados de tal modo que permiten la síntesis de todos los catalizadores implicados en la red a partir de unos precursores externos, S, T y U: El proceso metabólico (M), representado por las reacciones en rojo, recae en la actividad catalítica de STU y rinde ST. ST es utilizado a su vez por otro catalizador SU implicado en el proceso de reemplazo (R) de STU (reacciones en azul). Un tercer ciclo de catálisis, relacionado con una actividad secundaria de STU (reacciones en gris), es responsable del reemplazo de SU, y completa de este modo el cierre organizativo (OI). Los distintos productos del sistema están sometidos a una continua degradación. Los procesos de degradación (flechas discontinuas) se suponen reacciones no catalizadas e irreversibles. El resto de reacciones son todas reversibles (las constantes cinéticas directas k_i se definen en el sentido marcado por las flechas, y las reversas k_{-i} se refieren al sentido opuesto). La concentración de los precursores externos se considera constante. Los demás metabolitos se suponen todos de concentración variable.

En el esquema se distinguen una serie de metabolitos externos (S, T y U) que contribuyen en la construcción del sistema. En este trabajo, de ahora en adelante, estos son tratados como si fueran precursores disponibles en el entorno, es decir, su concentración se supone constante (por ejemplo, bajo una hipótesis de sopa primitiva, en la que son proporcionados por un gran reservorio o procesos químicos externos). Por otro lado existen una serie de metabolitos intermedios, algunos de ellos sometidos a degradación, implicados bien en procesos metabólicos (Figura 3.1, en rojo), o en procesos de reparación o reemplazo (Figura 3.1, en azul y gris), cuya concentración aquí se supondrá variable.

¹² Estos ciclos serán referidos en lo sucesivo como *ciclos catalíticos*. Por otro lado, nos referiremos en todo momento a catalizadores y no a enzimas, para evitar asociación con catalizadores biológicos de tipo complejos proteicos, que por su gran complejidad requerirían redes autoproduktivas mucho más complejas y quedarían por tanto relegados a etapas posteriores de la evolución prebiótica. En este sentido el término catalizador, más amplio, nos permite considerar en esta fase moléculas más sencillas como pequeños péptidos, oligonucleótidos o simplemente moléculas inorgánicas.

Atendiendo al hecho de que las moléculas biológicas presentan un tiempo de vida limitado, en el modelo original (Letelier et al., 2006) se consideraban dos procesos de degradación (r4 y r8) afectando a los metabolitos STU y SU, puesto que son precisamente los dos catalizadores principales que representan los ciclos $M + OI$, y R , respectivamente. Sin embargo, en dicho modelo no se consideraron degradaciones en las demás especies: Es razonable pensar que es redundante introducir reacciones adicionales de degradación sobre todos aquellos intermediarios que participan en estos mismos ciclos. No obstante, ST es un metabolito independiente, que resulta ser junto con STU y SU producto de las reacciones globales del sistema, por lo que no hay motivo alguno por el que no se deba incluir también un proceso de degradación sobre él. Nótese además que ST y SU se comportan de forma muy semejante: ambos se producen por la división de precursores construidos a partir de STU (STUST y STUSU) y ambos participan en la reacción de condensación que origina SUST. Consecuentemente, el modelo presentado en este trabajo incluye la degradación de ST (r11), de modo que ahora son los tres productos del sistema (STU, SU y ST) objeto de un inevitable deterioro o degradación¹³.

En el modelo cinético a analizar, las degradaciones de los catalizadores o productos (r4, r8, r11) son reacciones no catalizadas y se consideran irreversibles, como es razonable en procesos de degradación. Así, el sistema colapsa inevitablemente a no ser que los intermediarios sean regenerados a partir de los precursores S, T y U. Es precisamente la conjunción de los tres procesos o ciclos catalíticos interrelacionados la que permite la síntesis de todos los catalizadores implicados en la red y poder así hacer frente a la continua degradación a la que están sometidos, postulándose la red completa como un sistema cerrado a causas eficientes.

A excepción de las degradaciones, el resto de reacciones r_i se consideran reversibles. De acuerdo con la notación de la Figura 3.1, estas presentan una constante cinética k_i en el sentido de las reacciones marcado por las flechas y otra constante cinética reversa k_{-i} en el sentido opuesto al marcado por las flechas. En cuanto a la cinética, la velocidad de las distintas reacciones individuales se plantea siguiendo la ley de acción de masas¹⁴. De esta manera, por ejemplo la velocidad de la reacción r1 (v_1) queda definida como:

$$v_1 = k_1[S][STU] - k_{-1}[STUS] \quad \text{Ec. 3.2}$$

Así mismo, utilizando una aproximación determinista, la evolución temporal de las concentraciones de los distintos metabolitos intermedios queda descrita por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs):

¹³ Para mayor simplicidad, en el modelo no se especifica la naturaleza de los productos de degradación, ya que al tratarse de especies no reactivas, no afectan a la organización y dinámica del sistema y pueden ser por el momento obviados. Sí se tratará de su naturaleza y posibles efectos en el funcionamiento más adelante. En cualquier caso, debe señalarse que para mantener la coherencia termodinámica del modelo, su naturaleza debe ser distinta de la de los precursores; se tratarían de formas inactivas – por ejemplo s, t y u – que no pueden transformarse de nuevo en los precursores S, T y U, salvo por acoplamiento con una fuente de energía externa (radiación electromagnética, energía química, etc.).

¹⁴ Podría haberse elegido un modelo cinético más específico para describir los procesos catalíticos, como por ejemplo un mecanismo de Michaelis-Menten. Sin embargo, el rango de aplicabilidad de estos modelos es normalmente limitado, pues requiere de ciertos presupuestos que en muchas ocasiones se ignoran, pero que en modelos como éste pueden ser muy restrictivos (por ejemplo, la concentración de sustrato ha de ser mucho mayor que la de enzima para poder aplicar una cinética de Michaelis-Menten). En este caso, la cinética de acción de masas permite una descripción sencilla y aceptable, que además considera implícitamente el mecanismo de catálisis, al plantearse expresamente en cada una de las reacciones individuales de los ciclos catalíticos.

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{STU}]}{dt} &= k_{-1}[\text{STUS}] + k_3[\text{STUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] \dots \\
 &\quad \dots - k_1[\text{S}][\text{STU}] - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_4[\text{STU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] \\
 \frac{d[\text{STUS}]}{dt} &= k_1[\text{S}][\text{STU}] + k_{-2}[\text{STUST}] + k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{-1}[\text{STUS}] - k_2[\text{T}][\text{STUS}] - k_9[\text{U}][\text{STUS}] \\
 \frac{d[\text{STUST}]}{dt} &= k_2[\text{T}][\text{STUS}] + k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_{-2}[\text{STUST}] - k_3[\text{STUST}] \\
 \frac{d[\text{ST}]}{dt} &= k_3[\text{STUST}] + k_{-5}[\text{SUST}] - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{11}[\text{ST}] \\
 \frac{d[\text{SU}]}{dt} &= k_{-5}[\text{SUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_8[\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] \\
 \frac{d[\text{SUST}]}{dt} &= k_5[\text{ST}][\text{SU}] + k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_{-5}[\text{SUST}] - k_6[\text{U}][\text{SUST}] \\
 \frac{d[\text{SUSTU}]}{dt} &= k_6[\text{U}][\text{SUST}] + k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_7[\text{SUSTU}] \\
 \frac{d[\text{STUSU}]}{dt} &= k_9[\text{U}][\text{STUS}] + k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{10}[\text{STUSU}]
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 3.3}$$

3.2 Análisis estequiométrico

Se ha recurrido a un análisis estructural para evaluar con rigor la organización del sistema y sus mecanismos de cierre metabólico. La estructura metabólica del modelo (M, R) se ha estudiado mediante la aproximación del análisis estequiométrico en el estado estacionario. Para ello se ha utilizado el programa METATOOL (ver Material y Métodos). A efectos del funcionamiento de dicho programa, el producto de degradación de STU, SU y ST ha sido denominado como w para ser considerado como metabolito externo junto con los metabolitos S, T y U. El resto de metabolitos intermedios se han considerado internos.

METATOOL calcula los siguientes subconjuntos de reacciones (RS)¹⁵:

$$\begin{pmatrix} RS_1 \\ RS_2 \\ RS_3 \\ RS_4 \\ RS_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & v_5 & v_6 & v_7 & v_8 & v_9 & v_{10} & v_{11} \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}
 \tag{Ec. 3.4}$$

Como se observa en esta ecuación, ciertas reacciones operan en el estado estacionario con la misma velocidad. Concretamente $v_2 = v_3$, $v_4 = v_5 = v_6 = v_7$, y $v_8 = v_9 = v_{10}$. Se comprueba que las velocidades de degradación de los catalizadores STU y SU (v_4 y v_8 respectivamente) pertenecen a los mismos subconjuntos que sus correspondientes reacciones de reemplazo: v_4 con v_5 , v_6 y v_7 ; y a su vez v_8 con v_9 y v_{10} . Esto indica que el mecanismo de reemplazo es suficientemente eficiente para compensar la degradación de cada catalizador, al menos en una hipotética situación de estado

¹⁵ Los distintos subconjuntos se deben a ciertos metabolitos que admiten ser canalizados hacia rutas alternativas independientes. Por ejemplo, esto sucede para STUS, que procede de STU a través de v_1 y que puede convertirse alternativamente en STUST (v_3) o en STUSU (v_9).

estacionario. En cuanto a la degradación de ST, v_{11} opera a una velocidad distinta a la de cualquier otra reacción. No obstante, su compensación puede explicarse a partir de los elementos de la base convexa, como se expone a continuación.

La base convexa puede expresarse de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \\ v_9 \\ v_{10} \\ v_{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \lambda_1 + \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \lambda_2 + \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} \lambda_3 \quad , \lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \geq 0 \quad \text{Ec. 3.5}$$

Se observa que la base convexa tiene dimensión tres, lo cual quiere decir que se pueden expresar todas las velocidades de estado estacionario del sistema al menos como combinación lineal de tres de ellas (λ_1 , λ_2 y λ_3). Por ejemplo, estas tres velocidades podrían ser los tríos (v_4, v_8, v_{11}) , (v_7, v_{10}, v_{11}) , pero también otras combinaciones bien elegidas que desvelen λ_1 , λ_2 y λ_3 como (v_1, v_2, v_4) . En cualquier caso λ_1 , λ_2 y λ_3 deben ser mayores o iguales a cero. Esta convexidad viene impuesta por la irreversibilidad de v_4 , v_8 y v_{11} , que sólo admiten valores positivos o cero. Por tanto, ninguna reacción (ni siquiera reversible) puede operar en estado estacionario netamente en sentido reverso, con un flujo negativo.

Los tres elementos de la base resultantes (vectores de la ecuación anterior) se ilustran esquemáticamente en la Figura 3.2. El primero de ellos, b_1 , recoge aquellas reacciones del ciclo metabólico, el segundo, b_2 , incluye tanto las reacciones involucradas en el ciclo del metabolismo como en el de reparación, y el tercero, b_3 , corresponde con la ruta de reemplazo del catalizador de reparación SU. La reposición de ST se explica como consecuencia del funcionamiento del ciclo metabólico, tal como se deduce del primer elemento de la base, en el que v_1 , v_2 y v_3 compensan v_{11} . En realidad, las reacciones del proceso metabólico no sólo permiten compensar la degradación de ST sino que son responsables del continuo suministro al ciclo de reemplazo, ya que $v_3 = v_{11} + v_5$. Esto explica también porqué v_{11} no pertenece a su mismo subconjunto.

Por último, se han estudiado los *modos elementales de flujo* (EM), distribuciones de flujo que pueden operar en estado estacionario y que no son descomponibles. En este caso los modos elementales obtenidos son coincidentes con los elementos de la base (Figura 3.2). Analizados más a fondo, se observa que no son modos enzimáticamente automantenidos (siguiendo la terminología utilizada en (Montero et al., 2008)), ya que en cada uno de ellos participa algún catalizador que no es producido internamente por el propio modo elemental y por tanto requiere ser suministrado externamente para compensar su vida limitada. En efecto, STU actuando en b_1 y b_3 requiere b_2 para ser repuesto, pero al mismo tiempo ST y SU en b_2 necesitan un reemplazo desde b_1 y b_3 , respectivamente (ver de nuevo Figura 3.2). Así, ni b_1 ni b_2 ni b_3 pueden funcionar indefinidamente por separado.

Como conclusión, sólo la combinación de los tres modos elementales, es decir el sistema (M,R) en su conjunto, permite el total autoabastecimiento de catalizadores, lo cual se postula como requerimiento mínimo (no necesariamente suficiente) para contrarrestar las degradaciones y

posibilitar el funcionamiento indefinido del sistema. En relación con la base convexa anteriormente obtenida, esta reflexión supone que los parámetros λ_1 , λ_2 y λ_3 deben ser todos positivos. Se trataría pues de un sistema enzimáticamente automantenido indivisible. Esto en cualquier caso no demuestra que sea el mínimo sistema con esas características, sino sólo indica que es el más pequeño con el tipo concreto de estructura de red analizada.

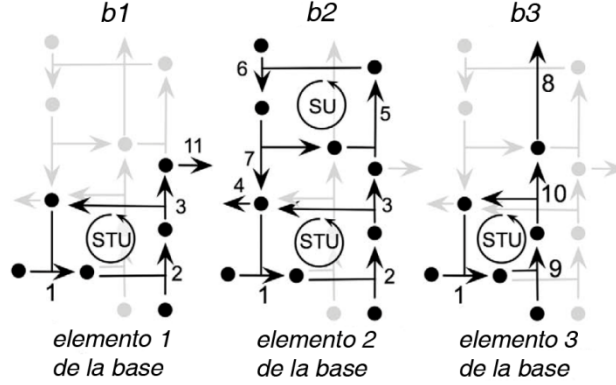


Figura 3.2 Representación esquemática de los elementos de la base convexa obtenidos para el modelo cinético de sistema (M,R) . Existen tres elementos de la base: El primero (b_1) recoge las reacciones 1, 2, 3 y 11, y por tanto corresponde con el ciclo metabólico. El segundo (b_2) incumbe tanto a las reacciones del ciclo metabólico como a las del ciclo de reemplazo de STU (contiene las reacciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7). El tercer elemento (b_3) contiene las reacciones 1, 8, 9 y 10, por lo que está relacionado con el proceso de reposición del catalizador de reemplazo SU. En la figura se resaltan los catalizadores requeridos en el funcionamiento de cada elemento. Si bien es posible relacionar los elementos de la base con tres modos elementales de flujo posibles, en realidad ninguno de ellos puede operar por separado: STU actuando en b_1 y b_3 requiere el elemento b_2 para ser reemplazado. A su vez, ST y SU en b_2 han de ser producidos a través de b_1 y b_3 , respectivamente.

3.3 Análisis de soluciones estacionarias

Para obtener los posibles estados estacionarios, se han igualado a cero todas las ecuaciones diferenciales ordinarias que describen la evolución temporal de las concentraciones de los metabolitos intermedios (Ecuación 3.3), obteniendo el siguiente sistema algebraico no lineal de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 & k_{-1}[\text{STUS}] + k_3[\text{STUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] \dots \\
 & \dots - k_1[\text{S}][\text{STU}] - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_4[\text{STU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] = 0 \\
 & k_1[\text{S}][\text{STU}] + k_{-2}[\text{STUST}] + k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{-1}[\text{STUS}] - k_2[\text{T}][\text{STUS}] - k_9[\text{U}][\text{STUS}] = 0 \\
 & k_2[\text{T}][\text{STUS}] + k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_{-2}[\text{STUST}] - k_3[\text{STUST}] = 0 \\
 & k_3[\text{STUST}] + k_{-5}[\text{SUST}] - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{11}[\text{ST}] = 0 \\
 & k_{-5}[\text{SUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_8[\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] = 0 \\
 & k_5[\text{ST}][\text{SU}] + k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_{-5}[\text{SUST}] - k_6[\text{U}][\text{SUST}] = 0 \\
 & k_6[\text{U}][\text{SUST}] + k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_7[\text{SUSTU}] = 0 \\
 & k_9[\text{U}][\text{STUS}] + k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{10}[\text{STUSU}] = 0
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 3.6}$$

Por de pronto, una cuidadosa inspección de estas últimas ecuaciones revela que existe una solución estacionaria trivial, que es aquella para la cual todas las concentraciones de los metabolitos son cero. Efectivamente, puesto que no existen términos independientes, las ecuaciones son válidas si se sustituyen todos los valores de concentración por cero. No obstante, para dilucidar si el sistema puede funcionar indefinidamente o no con concentraciones no nulas de intermediarios, es necesario analizar si existen además soluciones estacionarias no triviales.

En primer lugar se ha recurrido a un análisis simbólico para resolver las ecuaciones anteriores (Ecuación 3.6). El procedimiento concreto seguido se describe en el Apéndice I. Como se muestra en este apartado, tras varios pasos de simplificación y sustitución de unas variables por otras, se llega a una ecuación de quinto grado. Conocer de manera explícita las distintas soluciones posibles de estado estacionario pasa por resolver dicha ecuación. Lógicamente, se puede adelantar que admite cinco soluciones posibles. Sin embargo, al tratarse de una ecuación irresoluble¹⁶, no se puede determinar cuáles de estas cinco soluciones corresponden con valores de concentraciones reales positivos.

Como alternativa se ha procedido a calcular y resolver de modo numérico las expresiones explícitas halladas simbólicamente, sustituyendo cada parámetro por un cierto valor asignado libremente. Así por ejemplo, se han escogido para las constantes cinéticas y concentraciones de metabolitos externos los valores que figuran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Valores asignados a cada parámetro del modelo (M,R) presentado en la Figura 3.1.

Constante	Valor	Concentración	Valor (constante)
k_1 (k_1)	100 (10)	[S]	0.4
k_2 (k_2)	100 (10)	[T]	0.2
k_3 (k_3)	2 (10)	[U]	0.1
k_4	0.3		
k_5 (k_5)	10 (1)		
k_6 (k_6)	10 (1)		
k_7 (k_7)	0.1 (1)		
k_8	0.3		
k_9 (k_9)	1 (0.05)		
k_{10} (k_{10})	0.05 (0.5)		
k_{11}	0.3		

* Las unidades son arbitrarias, pero han de ser consistentes: las mismas unidades de tiempo y cantidad de materia se aplican a todo el modelo. Debe señalarse que los valores numéricos asignados a las concentraciones así como los valores numéricos de las constantes cinéticas de segundo orden han sido modificados de forma consistente respecto a los valores indicados en el artículo (Piedrafito et al., 2010) con objeto de obtener valores de concentraciones de un orden de magnitud menor, comparables con los del Capítulo 4, sin que ello afecte a los resultados cualitativos del modelo.

Al realizar estas sustituciones, ahora la ecuación de quinto grado mencionada presenta las siguientes raíces o soluciones numéricas para el valor de $[STU]^{\text{ss}}$: -1.206, -1.203, -0.037, 0.039 y 0.599. Tres de ellas son negativas y se pueden descartar al no tener sentido físico alguno. En lo que respecta a las otras dos, se han calculado de modo retrospectivo los valores numéricos del

¹⁶ No hay un método general de resolución (búsqueda de raíces) de ecuaciones de quinto grado. Ecuaciones polinómicas generales de grado igual o superior a cinco son irresolubles, como establece el teorema de Abel-Ruffini.

resto de concentraciones de estado estacionario, considerado las expresiones descritas en el Apéndice I que relacionan las distintas concentraciones entre sí y con el valor de $[STU]^{ss}$. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2. Todos los valores obtenidos en ambos casos son números reales positivos, de modo que se demuestra que, al menos en estas condiciones, existen dos estados estacionarios no triviales.

Tabla 3.2 Valores de concentración de estado estacionario no trivial de metabolitos intermedios del modelo (M,R) , obtenidos al sustituir los parámetros de las ecuaciones explícitas por los valores asignados en la Tabla 3.1.

Metabolito	$[X]^{ss}$ en estado estacionario (a)	$[X]^{ss}$ en estado estacionario (b)
STU	0.039	0.599
STUS	0.133	2.326
STUST	0.244	4.591
ST	0.691	1.432
SU	0.021	0.259
SUST	0.136	3.524
SUSTU	0.125	3.345
STUSU	0.137	3.100

Las soluciones estacionarias halladas han sido igualmente obtenidas por resolución numérica del sistema de ecuaciones algebraicas no lineales que resultan de igualar las ODEs a cero (Ecuación 3.6). Concretamente, se ha implementado en MATLAB el método numérico iterativo de Newton-Raphson para hallar ceros de funciones (ver Material y Métodos). Se ha ensayado varias veces el algoritmo utilizando los mismos valores de los parámetros de la Tabla 3.1 con diversos valores aleatorios de las variables de cebamiento, y se observa que el proceso iterativo converge a uno de los tres posibles estados anteriormente descritos: bien al estado estacionario trivial, o a uno de los dos estados de concentraciones no nulas descritos en la Tabla 3.2.

3.3.1 Estudio de estabilidad de estados estacionarios

Se ha analizado la estabilidad de cada uno de los tres estados estacionarios obtenidos con el valor de los parámetros propuesto en la Tabla 3.1. Para ello, en cada caso se ha planteado el sistema variacional particularizado para los valores de concentración estacionaria correspondientes, y seguidamente se ha calculado el determinante jacobiano así como sus autovectores y autovalores (ver Material y Métodos).

Tanto el estado estacionario trivial (de concentraciones nulas) como una de las soluciones no triviales (solución (b) en la Tabla 3.2) presentan todos los autovalores con parte real negativa (resultados no mostrados). Consecuentemente ambos son estados asintóticamente estables. En cambio, la solución no trivial restante, es decir la solución (a) de la Tabla 3.2, tiene uno de los autovalores con parte real positiva, y se trata por tanto de un estado estacionario inestable.

La existencia de *biestabilidad* o coexistencia de dos estados estacionarios asintóticamente estables para el valor de los parámetros estudiado, motiva un estudio dinámico exhaustivo para determinar qué condiciones iniciales conducen al sistema a uno u otro estado, y cómo cambian dichas soluciones estables al variar el rango de los parámetros explorado.

3.4 Análisis dinámico determinista

Siguiendo una aproximación determinista, se ha estudiado la evolución temporal de las concentraciones de los distintos metabolitos intermedios, a través de una serie de experimentos de integración numérica del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) anteriormente planteado (Ecuación 3.3). De manera complementaria, se ha analizado la evolución temporal de las velocidades de flujo neto de cada reacción i ($v_i - v_{-i}$).

3.4.1 Dependencia de concentraciones iniciales

En primer lugar se ha explorado el comportamiento dinámico de las concentraciones de metabolitos intermedios y las velocidades de reacción, para el valor de los parámetros para el que se calcularon anteriormente los estados estacionarios (Tabla 3.1). Resulta obvio que el sistema mostrado en la Figura 3.1 no puede funcionar si no dispone inicialmente de algún metabolito intermedio. Es decir, las concentraciones permanecen indefinidamente a cero si no existe ningún componente *propio* del sistema. Esto se explica fácilmente a la vista del esquema general de reacciones de la Figura 3.1: todas las reacciones de entrada de metabolitos externos en el sistema son reacciones bimoleculares y por tanto requieren la disponibilidad de un metabolito intermedio para poder operar. Sin embargo, ¿qué sucede cuando el sistema es cebado con alguno de los metabolitos intermedios? ¿Puede construirse y alcanzar un régimen funcional indefinido partiendo de suficientes cantidades de un solo catalizador o componente?

Se han ensayado varias concentraciones iniciales del intermediario STU, manteniendo para todas las demás especies concentraciones iniciales a cero. La evolución de las concentraciones así como el estado estacionario finalmente alcanzado dependen de la concentración inicial disponible de este intermediario (Figura 3.3): Para $0 \leq [\text{STU}]_{t=0} \leq 1.15$ el sistema colapsa, es decir, termina en el estado estacionario trivial con todas las concentraciones y flujos iguales a cero. Sin embargo, cuando $[\text{STU}]_{t=0} > 1.15$, evoluciona hasta alcanzar un régimen automantenido, es decir, un estado estacionario no trivial, caracterizado por concentraciones y flujos no nulos. Así, como se muestra en la Figura 3.3B y 3.3C, si bien el comportamiento inicial del sistema es cualitativamente parecido en ambas situaciones (insertos), las tendencias a largo plazo se vuelven totalmente distintas. Se observa por tanto una transición todo-nada al variar el valor de concentración inicial, indicada en la Figura 3.3A con una línea discontinua vertical.

Merece la pena detenerse a comentar el comportamiento de las velocidades de flujo neto en aquellos casos en que el sistema termina en un régimen automantenido (Figura 3.4). Una vez alcanzado dicho estado estacionario no trivial, obviamente las reacciones operan de modo constante. Se observa que todas las velocidades de reacción terminan adquiriendo valores positivos, de modo que el sistema funciona netamente en el sentido marcado por las flechas en el esquema de reacciones de la Figura 3.1, tal como se derivaba del análisis estequiométrico en estado estacionario (base convexa). Por otra parte, también de manera consistente con los resultados del análisis estructural, ciertas reacciones terminan operando siempre estequiométricamente, ya que en la Figura 3.4 se observan únicamente cinco valores característicos para las velocidades o flujos de estado estacionario. En efecto, estos conjuntos de velocidades no reflejan sino los cinco subconjuntos de reacciones obtenidos previamente con Metatool (Apartado 11.2): v_1^{ss} ; $v_2^{\text{ss}} = v_3^{\text{ss}}$; $v_4^{\text{ss}} = v_5^{\text{ss}} = v_6^{\text{ss}} = v_7^{\text{ss}}$; $v_8^{\text{ss}} = v_9^{\text{ss}} = v_{10}^{\text{ss}}$; v_{11}^{ss}

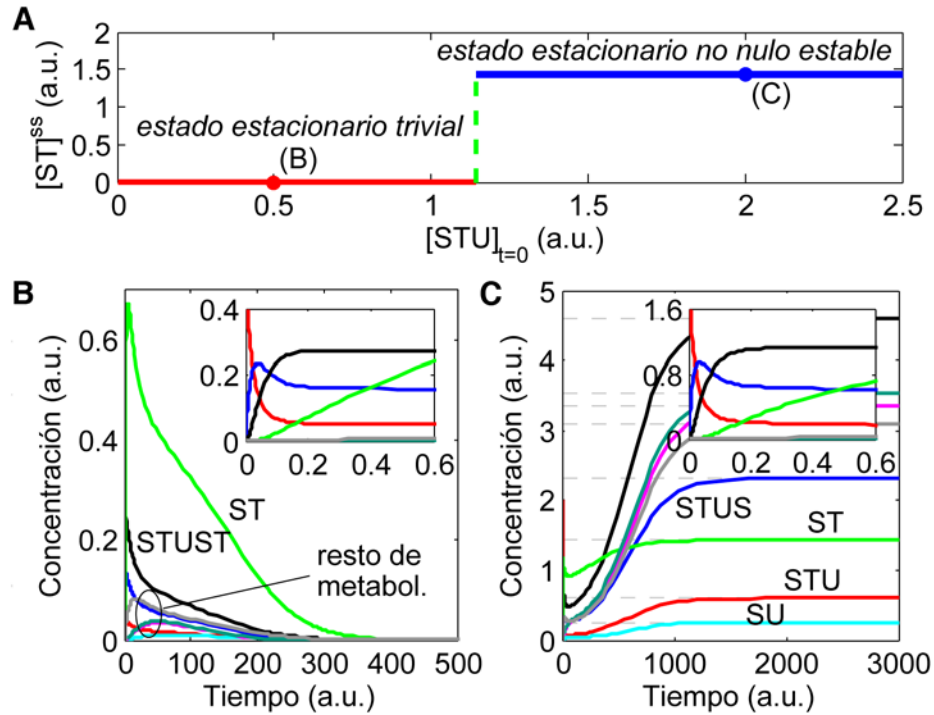


Figura 3.3 Estados estacionarios alcanzados por el sistema para el valor de los parámetros de la Tabla 3.1 ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$). Se realizaron integraciones numéricas con varios valores de la concentración inicial de STU ($[STU]_{t=0}$), manteniendo a cero las concentraciones iniciales del resto de intermediarios, y se permitió la evolución hasta que el sistema alcanzara un estado estacionario. (A) La línea mostrada en rojo corresponde con el estado estacionario trivial y la línea azul es el estado estacionario no trivial estable. La línea discontinua verde representa aquellos estados que no pueden ser alcanzados. (B-C) Evolución temporal de las concentraciones de intermediarios para las condiciones iniciales representadas por los puntos mostrados en rojo y azul, es decir $[STU]_{t=0} = 0.5$ (B) y $[STU]_{t=0} = 2.0$ (C), respectivamente.

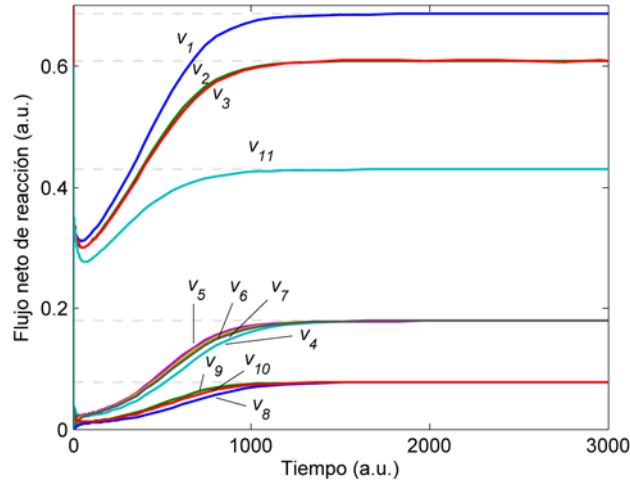


Figura 3.4 Evolución temporal de las velocidades de flujo neto de las distintas reacciones, partiendo de condiciones iniciales conducentes al estado estacionario no trivial estable (condiciones de la Figura 3.3C). Las velocidades adquieren valores positivos constantes característicos del estado estacionario no nulo estable. Ciertas reacciones terminan operando con la misma velocidad, de acuerdo con los subconjuntos de reacciones obtenidos mediante el análisis estequiométrico (ver texto).

Por supuesto, STU no es el único intermediario catalítico que puede emplearse para cebar el sistema. Como se resume en la Tabla 3.3, a excepción de ST y SU, un comportamiento dinámico semejante puede obtenerse partiendo como condición inicial de cualquier otro metabolito

intermedio distinto. Dependiendo de la cantidad inicial disponible, el sistema colapsa o se regenera, aunque lógicamente la concentración inicial crítica requerida para conducir al sistema al estado estacionario no trivial varía según el metabolito elegido como cebador.

El motivo por el que ST y SU no sirven por separado como cebadores iniciales se debe a que ninguno de los dos está involucrado directamente en una reacción de incorporación de metabolitos externos. Al intervenir sólo en reacciones bimoleculares con otros intermediarios, requieren de la presencia de al menos otro metabolito para poder reaccionar. No obstante, sí pueden ser utilizados de manera combinada: ST y SU pueden reaccionar entre ellos para dar el producto SUST, que ya es capaz de participar en reacciones adicionales y regenerar la red entera de reacciones.

En todo caso, los valores que adquieren las concentraciones en el estado estacionario no trivial son independientes de la identidad del metabolito usado como cebador y su concentración inicial, y coinciden con los presentados en la Tabla 3.2 para la solución estacionaria no nula estable (b). Esto sucede así también cuando se utiliza como condición inicial combinaciones de los diversos metabolitos. Por ejemplo, para el valor de los parámetros considerado (Tabla 3.1), $[ST]^{ss}$ toma siempre el valor 1.432 (ver de nuevo Tabla 3.3). Algo semejante sucede con el resto de metabolitos. En definitiva, el análisis dinámico corrobora la coexistencia de los dos estados estacionarios estables anteriormente predichos para el valor de los parámetros estudiado (Tabla 3.1), validando los valores de concentración de estado estacionario hallados por métodos analíticos.

Tabla 3.3 Valores de concentración de estado estacionario no trivial alcanzados a partir de distintos metabolitos como cebador.

Semilla	$k_4 = k_8 = k_{11} = 0.1$		$k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$	
	Conc. inicial mínima	$[ST]^{ss}$	Conc. inicial mínima	$[ST]^{ss}$
STU	0.014	1.563	1.146	1.432
STUS	0.014	1.563	1.137	1.432
STUST	0.014	1.563	1.138	1.432
ST	—	no estado estacionario	—	no estado estacionario
SU	—	no estado estacionario	—	no estado estacionario
SUST	0.036	1.563	0.990	1.432
SUSTU	0.028	1.563	0.885	1.432
STUSU	0.011	1.563	0.680	1.432
STU + SU	0.010	1.563	0.525	1.432
ST + SUST	0.030	1.563	0.814	1.432
SU + STUS	0.010	1.563	0.518	1.432
ST + SU	0.046	1.563	1.043	1.432

¿Qué sucede con el estado estacionario inestable predicho anteriormente? Lógicamente los experimentos de integración numérica nunca pueden mostrar una evolución temporal hacia dicha solución. Sin embargo, resulta obvio que los dos estados estacionarios anteriores (trivial y no nulo), al ser estables, han de estar separados por una barrera separatriz que determine qué condiciones iniciales provocan que el sistema termine en un estado o en el otro. Esto explica por ejemplo porqué se obtiene en la Figura 3.3 una transición todo-nada en los valores de $[ST]^{ss}$ al variar la condición de partida y atravesar un cierto umbral. La concentración inicial para la cual se detecta la discontinuidad ($[STU]_{t=0} = 1.15$) corresponde precisamente con condiciones situadas

en torno a la región separatriz. Y todas las concentraciones iniciales críticas para las que se detecta el salto de uno a otro estado estacionario obtenidas con otros metabolitos como cebo (Tabla 3.3), forman también parte de esta barrera separatriz. De la misma manera, el estado estacionario inestable debe estar contenido en esta región que limita las zonas de atracción de ambos estados estacionarios trivial y no trivial estables.

Se ha realizado un experimento sencillo de integración numérica partiendo de condiciones iniciales cercanas a los valores de concentración de estado estacionario inestable predichos (solución (a) en Tabla 3.2). Los resultados se recogen en la Figura 3.5. Con concentraciones iniciales ligeramente inferiores a las de dicho estado ($[ST]_{t=0} = 0.66$ y manteniendo el resto de concentraciones iguales a las del estado estacionario inestable), el sistema evoluciona hacia el estado estacionario trivial, donde todas las concentraciones se hacen cero. En cambio, con concentraciones iniciales ligeramente superiores (donde $[ST]_{t=0} = 0.72$; resto de concentraciones inalteradas), el sistema es capaz de construirse y tiende asintóticamente a la solución final de estado estacionario no trivial estable, con concentraciones no nulas de todos los intermediarios. En teoría, si se pudiera partir como condición inicial exactamente de los valores de estado estacionario inestable, el sistema permanecería en él indefinidamente. No obstante, en la práctica obviamente esto no es posible, ya que cualquier mínimo error numérico respecto a este estado termina alejando al sistema y conduciéndolo a alguno de los dos estados asintóticamente estables. Estos resultados demuestran de manera sencilla cómo el estado estacionario inestable se sitúa asociado a la región separatriz que limita ambas cuencas de atracción.

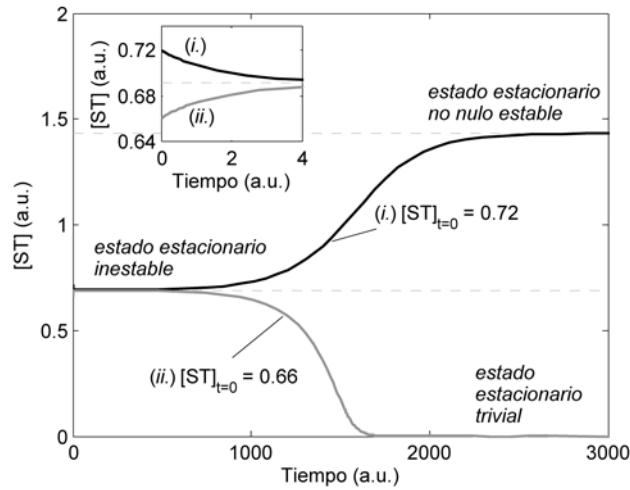


Figura 3.5 Evolución temporal de la concentración de ST partiendo de dos condiciones iniciales distintas cercanas al estado estacionario inestable, bien por encima de él (i.) (línea mostrada en negro) o por debajo de él (ii.) (línea mostrada en gris). En ambos casos se consideraron los valores de los parámetros que figuran en la Tabla 3.1, tomándose como condición inicial los valores de las concentraciones en el estado estacionario inestable, salvo para $[ST]_{t=0}$, que tomó el valor 0.72 y 0.66 respectivamente.

3.4.2 Multidimensionalidad y construcción de un diagrama de fases

Resulta útil presentar los resultados de integración en un diagrama de fases con el fin de ilustrar la barrera separatriz y las cuencas de atracción de los estados estacionarios estables. El problema es que en este caso, al tratarse de un modelo con ocho variables, el espacio fase presenta ocho dimensiones, tantas como intermediarios del sistema. Esto supone que la barrera separatriz adoptará la forma de una hipersuperficie, algo que es irrepresentable. Como alternativa, siendo conscientes de la sobresimplificación que conlleva, se ha representado en la Figura 3.6 un

subespacio de dos y de tres dimensiones, que permite describir suficientemente bien la localización de los estados estacionarios y la disposición de la barrera separatriz para aquellas condiciones de los parámetros que figuran en la Tabla 3.1 ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$).

El procedimiento para reconstruir la barrera separatriz que figura en la Figura 3.6A ha sido el siguiente: Se han realizado sucesivos experimentos de integración numérica considerando como condición inicial valores de concentración de estado estacionario inestable para todos los intermediarios, salvo los dos cuya concentración aparece en el diagrama, ST y STU. En cada experimento se ha asignado una concentración inicial a STU y se han realizado integraciones numéricas con distintos valores de concentración inicial de ST¹⁷, con el propósito de acotar el valor de $[ST]_{t=0}$ para el que se registra el cambio de comportamiento en la evolución temporal y solución final alcanzada, signo de paso de la barrera separatriz. Una vez anotado para esas condiciones el valor umbral de $[ST]$, se procede de igual manera a barrer valores de $[ST]$ con un nuevo experimento en el que $[STU]_{t=0}$ toma otro valor. Y así sucesivamente hasta conseguir todas las coordenadas que definen la línea punteada de la Figura 3.6A. A su vez, el procedimiento para hallar la barrera separatriz de la Figura 3.6B es semejante, sólo que en este caso se requiere barrer el valor umbral de $[ST]$ no sólo para distintos valores de $[STU]$, sino también para distintos valores de $[SU]$, para conseguir una superficie separatriz tridimensional.

Como se ha señalado antes, con el proceso anterior sólo se llega a explorar en tres de las ocho dimensiones. No se consigue captar el aspecto entero de la barrera separatriz, en toda su amplitud. En cualquier caso, todas aquellas concentraciones iniciales críticas para las que se registraba una transición todo-nada en los experimentos de la Tabla 3.3, deben pertenecer también a la barrera separatriz que delimita las cuencas de atracción de ambos estados estacionarios estables. Así, si esta hipersuperficie fuera representable, estas condiciones figurarían como coordenadas (puntos aislados) integradas en ella.

En ambas representaciones de la Figura 3.6 se observa precisamente que el estado estacionario inestable (punto verde) se encuentra embebido en la superficie separatriz. Se trata de una solución de tipo *punto silla*: Al presentar todos los autovalores con parte real negativa, salvo uno con parte real positiva (ver de nuevo Apartado 3.3.1), existe un plano (realmente hiperplano), el de la barrera separatriz, para el que la solución se comporta como estable (variedad invariante), siendo inestable en el resto de direcciones del espacio fase. Como reflejan las órbitas mostradas en la figura, integraciones numéricas realizadas con condiciones iniciales muy próximas a las de la solución estacionaria inestable, como las de la Figura 3.5, conducen de manera muy directa bien al estado estacionario trivial estable, o al no trivial estable. En cambio, órbitas que pasaran exactamente por la superficie separatriz, irían dirigidas hacia el punto silla, como se indica en este caso de modo esquemático con flechas (Figura 3.6A).

¹⁷ Con el fin de conseguir una rápida convergencia y evitar explorar demasiados valores de $[ST]$, se ha seguido un algoritmo de búsqueda inspirado en el método numérico de bisección (habitualmente usado para calcular raíces de una función acotadas entre dos puntos): Se consideran dos valores de $[ST]$ extremos, 'a' y 'b' (siendo $a < b$), situados en zonas del espacio fase donde el sistema evoluciona hacia soluciones finales distintas, y se realiza una primera integración con un valor de $[ST]_{t=0} = a + (b-a)/2$. Si el sistema evoluciona hacia la solución trivial, se reajusta a (el menor de ellos), asignándosele el valor que tomaba $[ST]_{t=0}$. Y $[ST]_{t=0}$ se recalcula para la siguiente integración, en la que ahora la condición inicial estará más próxima a b . Por el contrario si el sistema evoluciona hacia la solución no trivial, se reajusta b con el valor que tomaba $[ST]_{t=0}$. Así, en la siguiente integración, $[ST]_{t=0}$ tomará un valor más próximo a a . El algoritmo se repite en sucesivas integraciones numéricas hasta localizar con una cierta precisión el umbral de cambio de comportamiento, es decir, la barrera separatriz.

Por último, en el diagrama de la Figura 3.6A se han añadido además, de manera ficticia, otras órbitas, con fines ilustrativos (flechas en rojo). El destino de las órbitas está determinado por la cuenca de atracción donde se localizan, sin poder en ningún caso atravesar la barrera separatriz o cruzarse entre sí.

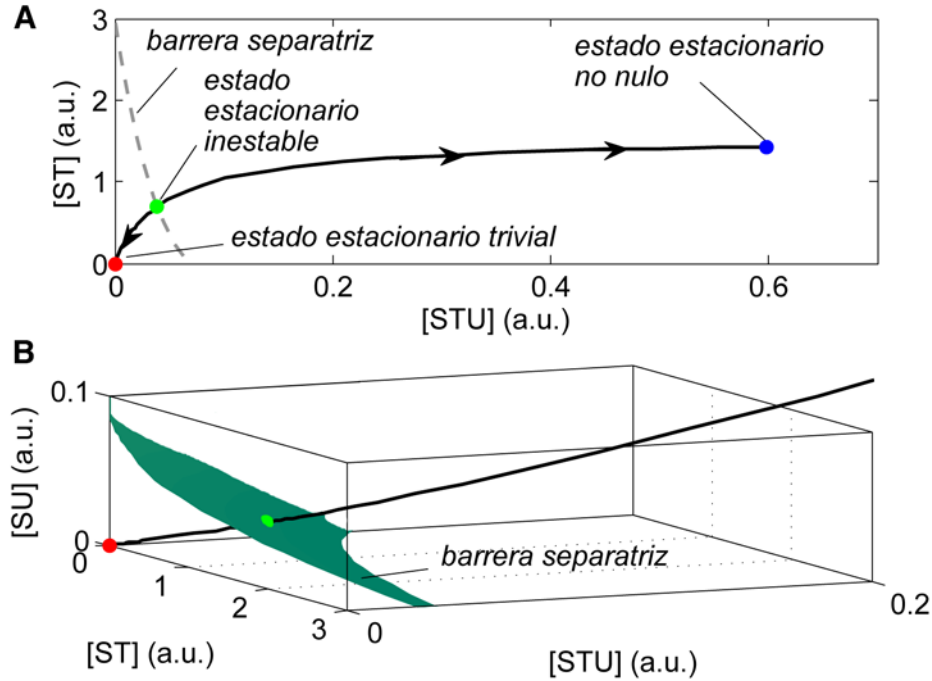


Figura 3.6 Secciones del diagrama de fases multidimensional obtenidas para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$. El punto en verde muestra el estado estacionario inestable, contenido en una barrera separatriz (línea punteada en 2D (A); plano verde en 3D (B)) que delimita ambas cuencas de atracción del estado estacionario estable trivial (punto rojo) y del estado estacionario no nulo estable (punto azul). Las líneas negras indican órbitas obtenidas por integración numérica partiendo de condiciones iniciales muy próximas a las concentraciones del estado estacionario inestable.

3.4.3 Dependencia de velocidades de degradación: diagrama de bifurcación

Hasta ahora, todos los experimentos previos se han realizado únicamente con los valores de los parámetros señalados en la Tabla 3.1. Pero, ¿qué comportamiento se obtiene al explorar el sistema con otros valores de los parámetros? En especial, puede resultar interesante explorar cómo afecta el valor de las constantes cinéticas de degradación de los catalizadores STU, SU y ST al comportamiento dinámico del sistema, y si condiciona el número y tipo de soluciones estacionarias que se obtienen. Por este motivo se han diseñado nuevos experimentos de integración numérica de las ODEs (Ecuación 3.3) para distintos valores de las constantes de degradación k_4 , k_8 y k_{11} comprendidos en el rango 0 – 0.6, manteniendo otras constantes con los valores de la Tabla 3.1. En cada caso se ha prestado especial atención a las soluciones finales alcanzadas con distintas concentraciones iniciales de partida.

Se obtienen dos regímenes bien diferenciados:

- Para $k_4 = k_8 = k_{11} \geq 0.367$ el sistema colapsa irremediabilmente, es decir, es incapaz de construirse y automantenerse, incluso cuando es cebado con altas concentraciones de STU, y siempre termina en un estado estacionario trivial en el que todas las velocidades y concentraciones se hacen cero.

- Para $0 \leq k_4 = k_8 = k_{11} < 0.367$ dos estados finales son posibles: Dependiendo de la concentración inicial de metabolitos disponible, el sistema puede colapsar en la solución trivial, o bien construirse y alcanzar un régimen automantenido de concentraciones no nulas de intermediarios. A esta última región del espacio de parámetros pertenecen los experimentos del Apartado 3.4.1 para los que $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$.

Este comportamiento se ratifica con el análisis de soluciones estacionarias: en ambos casos los valores de concentración final obtenidos para cada valor de los parámetros k_4 , k_8 , k_{11} corresponden con soluciones de estado estacionario y son asintóticamente estables. Además, este análisis revela la existencia adicional de un estado estacionario inestable que se extiende a lo largo de todo el espacio de parámetros para el que coexisten la solución trivial y no trivial estables ($0 \leq k_4 = k_8 = k_{11} < 0.367$).

El diagrama de bifurcación de la Figura 3.7 resume como cambian el tipo de soluciones estacionarias y sus valores de concentración con el valor de las constantes de degradación. Por simplicidad, sólo se muestran los efectos sobre la concentración de ST, pero resultados cualitativamente semejantes se han obtenido para el resto de intermediarios. En la figura se corrobora que cuando los valores de las constantes de degradación son relativamente bajos, el régimen es *biestable*: de modo semejante a como sucediera en los experimentos del Apartado 3.4.1, el sistema es capaz de alcanzar un estado estacionario estable de coexistencia de concentraciones no nulas (Figura 3.7, línea azul), siempre y cuando se parta de condiciones iniciales superiores a las de la barrera separatriz a la cual está asociado el estado estacionario inestable (Figura 3.7, línea discontinua). De otra manera colapsa en la solución trivial (Figura 3.7, línea roja). Obviamente, los valores de $[ST]^{ss}$ cambian ligeramente dependiendo de las constantes de degradación. Sin embargo, a medida que aumentan los valores de las constantes k_4 , k_8 , k_{11} , el estado estacionario inestable se va aproximando a los valores del estado estacionario estable no trivial, y por tanto, se requieren mayores concentraciones iniciales para lograr alcanzar dicha solución final de automantenimiento (ver de nuevo Tabla 3.3). Finalmente ambos estados estacionarios terminan convergiendo en un punto de bifurcación ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367$). Se puede decir entonces que el estado estacionario inestable ha “absorbido” (o se ha cancelado conjuntamente con) la solución no trivial. Consecuentemente, por encima de este punto crítico existe monoestabilidad de la solución estacionaria trivial y el sistema es incapaz de persistir.

En la situación extrema en que $k_4 = k_8 = k_{11} = 0$, no hay degradación posible de los catalizadores y el sistema alcanza el equilibrio termodinámico. Sólo entonces desaparece el estado estacionario inestable y cualquier mínima concentración no nula de algún metabolito es suficiente para aumentar la concentración de todos los demás. Se alcanzan así valores finales de estado estacionario no nulo que corresponden con valores de equilibrio, para los cuales las reacciones reversibles de entrada de S, T y U operan con la misma velocidad en ambos sentidos, y en definitiva, todas las velocidades de flujo neto de las reacciones se igualan a cero (Figura 3.8). Únicamente si no se dispone en absoluto de ningún metabolito, el sistema es incapaz de incorporar S, T ó U y se mantiene en estado estacionario trivial con $[ST]^{ss} = 0$.

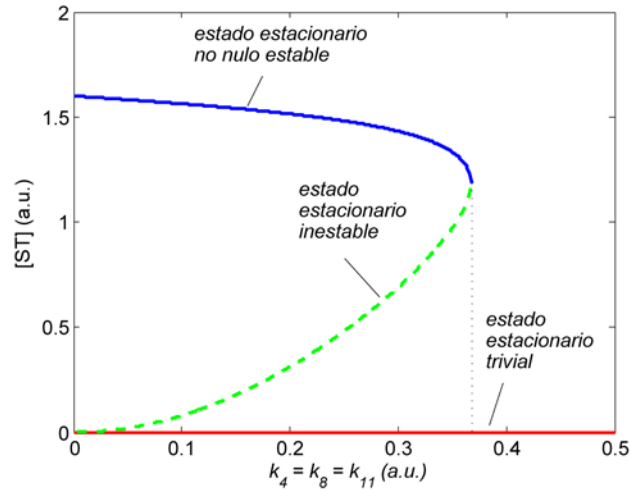


Figura 3.7 Diagrama de bifurcación. El sistema sólo puede alcanzar un estado estacionario estable de coexistencia de concentraciones no nulas para valores de las constantes de degradación relativamente bajos ($0 \leq k_4 = k_8 = k_{11} < 0.367$). En esta región del espacio de parámetros existe biestabilidad, y el estado estacionario no nulo estable (en azul) está separado de la cuenca de atracción de la solución trivial por un estado estacionario inestable (línea verde discontinua). Pero por encima de un punto crítico ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367$) la única solución posible es el estado estacionario trivial (en rojo), y el sistema colapsa. En tal situación sólo es posible la recuperación del sistema si las constantes de los procesos de degradación vuelven a bajar hasta valores cercanos a la condición de equilibrio ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0$), como indican las flechas. En esta zona bastaría disponer inicialmente de mínimas trazas de algún metabolito para volver a recuperar la solución no trivial estable.

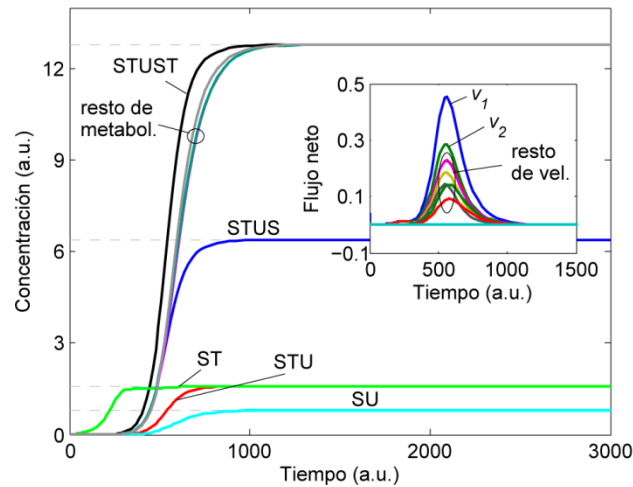


Figura 3.8 Comportamiento dinámico del sistema en condiciones de ausencia total de degradación de los catalizadores ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0$). Se muestran los resultados de integración numérica obtenidos partiendo de mínimas concentraciones de STU: $[STU]_{t=0} = 0.001$ (resto de concentraciones iniciales de metabolitos intermedios iguales a cero). Inicialmente, las concentraciones de los distintos intermediarios aumentan, y también lo hacen las velocidades de flujo neto de las reacciones (inserto). No obstante, al no existir salidas del sistema y ser las reacciones de entrada de los precursores reversibles, las velocidades de los procesos operando en uno y otro sentido terminan igualándose: las concentraciones se “estancan” en valores de equilibrio y las velocidades de flujo neto de las reacciones se vuelven iguales a cero.

De manera adicional, la Figura 3.9 muestra esquemáticamente el efecto que causaría en el plano fase el tipo de bifurcación obtenido al variar los valores de las constantes de degradación. La convergencia del estado estacionario inestable con el estado estacionario trivial y con el no nulo (puntos críticos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0$ y $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367$, respectivamente), marca los límites de

los distintos regímenes posibles en el comportamiento de las órbitas. Debe recordarse de nuevo que las concentraciones de los estados estacionarios hallados para cada valor de los parámetros toman valores que son independientes de las condiciones iniciales de integración. Por eso se obtienen para los estados estacionarios valores puntuales en la Figura 3.9 (líneas y no superficies en la Figura 3.9).

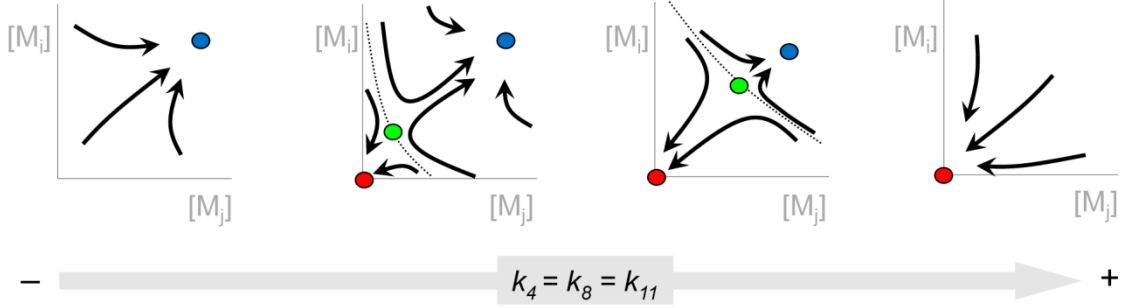


Figura 3.9 Representación esquemática de los cambios producidos en un plano fase al cambiar los valores de las constantes de degradación. El punto azul representa las concentraciones en el estado estacionario no nulo estable. En rojo figura el estado estacionario trivial, y en verde el estado estacionario inestable. Las flechas negras indican las tendencias de las órbitas hacia los estados estacionarios estables. En la zona de biestabilidad, éstas nunca pueden atravesar la barrera separatriz (línea gris punteada), y definen dos cuencas de atracción distintas.

3.4.4 Dependencia de velocidades de degradación: balance entre modos elementales

¿Cuál es el efecto de los valores de las constantes cinéticas de degradación sobre los flujos o velocidades de reacción de estado estacionario? Como ya se ha comentado en el análisis estequiométrico presentado en el Apartado 3.2, la irreversibilidad de las reacciones r_4 , r_8 y r_{11} restringe el número de combinaciones lineales posibles entre los elementos de la base que expresan todas las velocidades de estado estacionario del sistema. De esta manera, los parámetros λ_1 , λ_2 y λ_3 únicamente pueden ser positivos. Ahora bien, puesto que los tres modos elementales hallados son coincidentes con los elementos de la base (ver Figura 3.2) y cada uno de ellos representa un mecanismo esencial en el mantenimiento del sistema ($b_1 = \text{EM}_1$, metabolismo; $b_2 = \text{EM}_2$, metabolismo + reemplazo; $b_3 = \text{EM}_3$, recuperación del catalizador de reemplazo), resulta de especial interés calcular los valores específicos que toman en el estado estacionario estable no trivial los parámetros λ_1 , λ_2 y λ_3 , y evaluar como cambian al variar los valores de las constantes cinéticas de degradación.

El procedimiento ha consistido en evaluar el valor numérico que toman las velocidades de flujo neto de las reacciones, en el estado estacionario no trivial obtenido para las distintas condiciones de k_4 , k_8 y k_{11} (con el resto de valores de los parámetros como los de la Tabla 3.1). Las velocidades representadas en un único elemento de la base permiten determinar en cada caso el valor concreto que toman λ_1 , λ_2 y λ_3 . Esto sucede por ejemplo con v_4 (sólo en el elemento de la base b_2), con v_8 (sólo en b_3) y con v_{11} (sólo en b_1). Así, por ejemplo a partir del estado estacionario obtenido para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$ (resultados de la Figura 3.4), se infiere: $\lambda_1 = v_{11} = 0.430$; $\lambda_2 = v_4 = 0.180$; $\lambda_3 = v_8 = 0.078$. De modo semejante se han hallado λ_1 , λ_2 y λ_3 para los valores de estado estacionario obtenidos con otros valores de k_4 , k_8 y k_{11} (Figura 3.10).

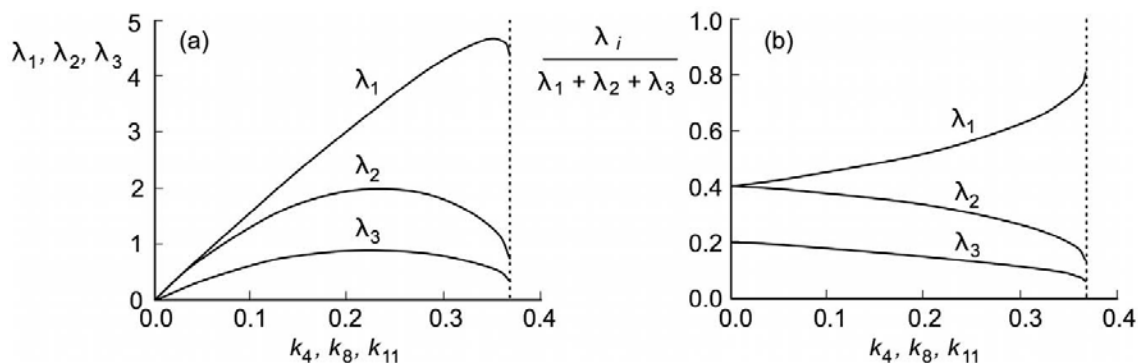


Figura 3.10 Contribución de los elementos de la base convexa a la distribución de flujo en estado estacionario, para distintos valores de las constantes cinéticas de degradación. (A) λ_1 , λ_2 y λ_3 representan la contribución del primer elemento (b_1), el segundo (b_2) y el tercero (b_3), respectivamente. (B) La contribución relativa de cada uno de los tres elementos de la base convexa se ilustra sobre el mismo rango de valores de k_4 , k_8 y k_{11} .

Curiosamente, a la vista de los resultados de la Figura 3.10A, se observa que los valores de los tres parámetros λ_1 , λ_2 y λ_3 experimentan primero un aumento y posteriormente una disminución, a medida que aumentan los valores de las constantes cinéticas de degradación. Esto indica la existencia de un óptimo (una zona de máxima eficacia) en la velocidad de operación del sistema, situado en torno al rango 0.20 – 0.34 de valores de k_4 , k_8 y k_{11} . Por debajo de estos valores el sistema opera más lentamente, probablemente porque al ser muy escasa la velocidad de degradación, se acumulan mucho los metabolitos intermedios, contrarrestando el flujo neto entrante y conduciendo al sistema hacia una situación próxima al equilibrio. Como contrapartida, por encima del rango de máxima operación, las constantes de degradación toman valores demasiado grandes, y no permiten una óptima acumulación de metabolitos. En esas condiciones el factor limitante para la operación no consiste en la reversibilidad de los flujos entrantes, sino en una concentración demasiado baja de metabolitos intermedios, que impide el correcto flujo de las reacciones directas r_i .

Otro aspecto interesante es la contribución relativa de cada elemento de la base (o modo elemental de flujo) a la distribución global de flujos de estado estacionario (Figura 3.10B). A medida que las constantes de degradación crecen, la contribución relativa de b_2 y b_3 va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar el punto de bifurcación ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367$), en el que el sistema colapsa. Se puede postular que la desarticulación del sistema se desencadena precisamente porque las velocidades de los procesos de reemplazo, representadas por esos elementos de la base, alcanzan un punto en que se vuelven incapaces de compensar las elevadas velocidades de degradación. Esto conduce a pensar que podría incluso existir un umbral de contribución mínima del proceso de reparación para asegurar la estabilidad del sistema (M, R) (en torno a 0.135 para b_2 y 0.060 para b_3 , para las condiciones de estudio), y que el sistema se desmantela justamente cuando este umbral es atravesado.

3.4.5 Robustez dinámica

Con el análisis dinámico realizado hasta ahora queda claro que el sistema descrito es capaz de alcanzar un estado estacionario no trivial estable, con flujos finitos y coexistencia de concentraciones no nulas de intermediarios. Además este régimen estacionario es relativamente

robusto¹⁸ respecto a variaciones en los valores de las constantes de degradación de los catalizadores. No obstante, antes de que este modelo pueda ser propuesto como un modelo representativo de un sistema automantenido, y por tanto relevante para el estudio de las primeras etapas de evolución del metabolismo, debe probarse, entre otros factores, su robustez dinámica frente a la pérdida catastrófica de uno o varios de sus intermediarios o catalizadores.

Para analizar esta capacidad de recuperación, se han realizado experimentos de integración numérica partiendo de condiciones de estado estacionario no trivial estable, en los que en un momento dado se fuerza a dejar todas las concentraciones de intermediarios del ciclo de STU (es decir STU, STUS, STUST y STUSU) a cero, dejando el resto inalterados. Como se muestra en la Figura 3.11 para las condiciones de $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3$, después de esta pérdida de parte de los metabolitos, todas las concentraciones de intermediarios se recuperan, alcanzando de nuevo sus valores originales de estado estacionario.

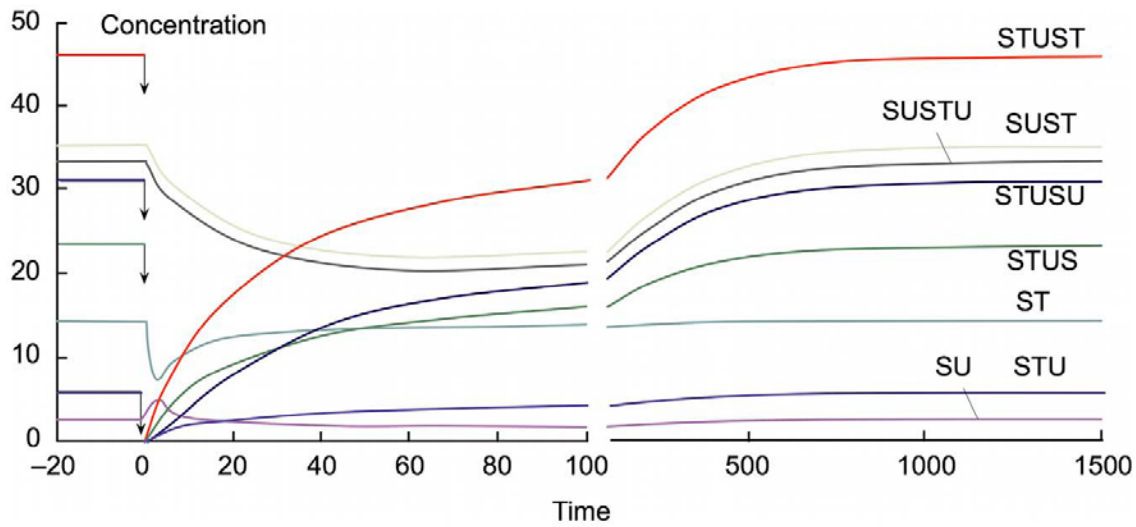


Figura 3.11 Robustez dinámica del sistema (M,R) frente a la pérdida catastrófica de un catalizador. La figura muestra para $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3$ la evolución temporal de las concentraciones de intermediarios (originalmente en estado estacionario estable no trivial) tras dejar abruptamente a cero las concentraciones de todas las formas integradas en la actividad catalítica de STU (es decir, no sólo STU como tal, sin también STUS, STUST y STUSU), según señalan las flechas.

Y como es de esperar, sabiendo que la desaparición de STU es la más restringente (ya que participa tanto en la síntesis de SU como en la de ST), un comportamiento semejante se obtiene cuando en lugar de STU se pierden todas las formas relacionadas con SU, del ciclo de reemplazo. En ambos casos los resultados son coherentes con la gran capacidad que mostraba el sistema para construirse a partir de mínimas concentraciones de tan solo alguno de sus metabolitos (Tabla 3.3). En definitiva, siempre y cuando el sistema no se perturbe hasta tal grado que se atraviese la barrera separatriz, volverá a la misma solución estacionaria no trivial. Lo mismo sucede cuando en lugar de provocar una disminución de uno de los metabolitos, el sistema debe responder a concentraciones anormalmente altas de uno de ellos: de nuevo retorna a dicho estado. Todo ello indica que el sistema es altamente robusto, no sólo a perturbaciones infinitesimales, como

¹⁸ A la capacidad que presenta un sistema para soportar cambios en los valores de los parámetros sin alterar su comportamiento general se le denomina *robustez estructural*. En cambio la *robustez dinámica* hace referencia a la capacidad de responder compensadamente a cambios en sus variables de estado (en el caso de estudio, a cambios en las concentraciones de los intermediarios).

corroborar el análisis de estabilidad de estados estacionarios, sino también a grandes perturbaciones.

Capítulo 4

4 Confinamiento del sistema en volúmenes pequeños: efecto de las fluctuaciones en el automantenimiento

El análisis determinista realizado anteriormente en el Capítulo 3 (Piedrafita et al., 2010) demuestra que el sistema de la Figura 3.1 es capaz, en un amplio rango de parámetros cinéticos, de reponer los catalizadores a pesar de su continua degradación, alcanzando así un régimen automantenido robusto. No obstante, para poder profundizar en su estudio como posible modelo protometabólico, es necesario considerar otra serie de factores que pudieron ser decisivos para la emergencia y mantenimiento de este tipo de sistemas en un escenario prebiótico. Uno de esos factores es el volumen en el que las reacciones prebióticas se desarrollaron. Probablemente los sistemas protobiológicos se desarrollaron confinados en volúmenes pequeños (por ejemplo, microcavidades o poros en partículas minerales, vesículas lipídicas, agregados, etc.) (Wächtershäuser, 1988; Deamer, 1997), y por tanto, al presentar un bajo número de moléculas, debieron estar sujetos a grandes fluctuaciones en las concentraciones. En este sentido, el problema escapa al análisis determinista, que queda limitado a una descripción preliminar macroscópica (en ausencia de fluctuaciones). Por este motivo, se ha planteado una segunda aproximación estocástica para estudiar el efecto de las fluctuaciones derivadas del *ruido interno* en el comportamiento del sistema (Piedrafita et al., 2012a)¹⁹. ¿Qué papel juegan las fluctuaciones en el funcionamiento? ¿Se mantienen las conclusiones derivadas del análisis determinista?

¹⁹ Se distinguen dos tipos de fuentes de impredecibilidad o fluctuaciones inherentes a un sistema: el ruido en los parámetros o condiciones de contorno impuestas sobre el sistema, denominado ruido externo; y el ruido en las variables (por ejemplo, como consecuencia del movimiento Browniano e impredecibilidad de las colisiones moleculares), denominado ruido interno. En esta sección nos centraremos solamente en el ruido interno para analizar la repercusión de las fluctuaciones producidas en las concentraciones de intermediarios como consecuencia de su confinamiento.

4.1 Adaptación del modelo cinético y consideraciones de simulación

Al igual que en el análisis determinista, se ha considerado el esquema de reacciones de la Figura 3.1, tratando todas las reacciones como reversibles, exceptuando las de degradación, que de nuevo se consideran irreversibles. Y salvo cuando se indica lo contrario, durante las simulaciones se mantiene el supuesto de valores constantes de concentración (o número de moléculas) de los metabolitos externos S, T y U. Sin embargo, ha sido necesario adaptar el modelo para el estudio estocástico, para lo cual se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones previas:

- Se han asignado de forma consistente unidades, tanto a los valores de las **constantes cinéticas** como a los de las **concentraciones** del modelo, que anteriormente, en el estudio determinista tomaban unidades arbitrarias. Ahora las concentraciones se expresan en milimolar (mM), si bien el tiempo se sigue manteniendo expresado en unidades arbitrarias (que denominaremos τ), en ausencia de argumentos claros en pro de una escala temporal concreta para el tipo de procesos prebióticos definidos²⁰. Por tanto, las constantes cinéticas de procesos monomoleculares (con dimensión tiempo⁻¹) toman unidades τ^{-1} , mientras que aquellas de procesos bimoleculares (dimensión concentración⁻¹ tiempo⁻¹) unidades mM⁻¹ τ^{-1} . En cualquier caso, los parámetros se mantienen con los mismos valores numéricos que se les asignó para el análisis determinista previo, es decir con los valores que aparecen en la Tabla 4.1, con objeto de garantizar las mismas “reglas” o condiciones de estudio. Tal como se muestra, todos ellos toman valores fijos, excepto k_4 , k_8 y k_{11} que se hacen variar en el rango 0 – 0.6 τ^{-1} .
- Se ha introducido un nuevo parámetro *volumen del sistema* V , que permite transformar las distintas concentraciones de metabolitos a número de moléculas. Aunque se han realizado simulaciones a distintos volúmenes del sistema, se ha prestado especial atención a valores de volumen pequeños, del orden de 10^{-16} – 10^{-21} L, ya que podrían ser característicos de compartimentos prebióticos (Walde, 2006), y permiten estudiar en detalle el comportamiento dinámico lejos del *límite determinista*²¹, en situaciones en que predominan las fluctuaciones. Como referencia, el límite superior (10^{-16} L) se corresponde aproximadamente con el volumen de una

²⁰ En verdad, la elección de expresar las concentraciones en unidades de mM es, en parte, también arbitraria: no existen evidencias suficientes para determinar en qué rango de concentraciones se encontrarían, en condiciones prebióticas, los precursores e intermediarios involucrados en este tipo de redes protometabólicas. No obstante, concentraciones del orden de nM, μ M o mM serían razonables para especies que participan en medio acuoso en procesos químicos de autoorganización. Por ejemplo, modelos *in vitro* de compartimentos prebióticos autoensamblados consideran concentraciones de compuestos anfífilicos en agua del orden de mM (Monnard y Deamer, 2002; Thomas y Rana, 2007), y ciertos modelos *in vitro* de sistemas autocatalíticos utilizan péptidos o ribozimas en concentraciones del orden de μ M (Ashkenasy et al., 2004; Lincoln y Joyce, 2009). Aquí se ha preferido elegir como referencia unidades de mM, entendiendo que cantidades relativamente abundantes de intermediarios posibilitarían – al menos localmente – la preponderancia de éstos sobre otros compuestos presentes en la sopa primitiva, y serían más favorables para el correcto desarrollo de los sistemas protobiológicos, al evitar en mayor medida el efecto de las posibles reacciones adversas.

²¹ El límite determinista representa conceptualmente aquella situación para la cual los resultados del análisis estocástico (descripción microscópica) reproducen estadísticamente el comportamiento determinista del sistema (descripción macroscópica). En el caso en estudio, esto sucedería si se considerara un volumen del sistema muy grande, tal que las poblaciones moleculares alcanzaran grandes valores y las fluctuaciones fueran insignificantes para modificar la dinámica.

mitocondria ($\sim 0.5 \mu\text{M}$ de diámetro) (Nealson, 1999), mientras el límite inferior (10^{-21} L) equivale al volumen de una esfera de unos 14 nm de diámetro.

Tabla 4.1 Valores de constantes cinéticas y concentraciones fijas de metabolitos externos.

Reacciones de 1 ^{er} orden (τ^{-1})	Reacciones de 2 ^a orden ($\text{mM}^{-1} \tau^{-1}$)
$k_{-1} = 10$	$k_1 = 100$
$k_{-2} = 10$	$k_2 = 100$
$k_3 = 2$	$k_{-3} = 10$
$0 < k_4 < 0.6$	
$k_{-5} = 1$	$k_5 = 10$
$k_{-6} = 1$	$k_6 = 10$
$k_7 = 0.1$	$k_{-7} = 1$
$0 < k_8 < 0.6$	
$k_{-9} = 0.05$	$k_9 = 1$
$k_{10} = 0.05$	$k_{-10} = 0.5$
$0 < k_{11} < 0.6$	
Concentraciones (mM)	
$[S] = 0.4$	
$[T] = 0.2$	
$[U] = 0.1$	

* Se conservan los valores numéricos de la Tabla 3.1, si bien ahora se explicitan las unidades de concentración.

Si bien el tiempo es la única dimensión que se deja con unidades arbitrarias, es importante tener en cuenta que siempre que se hiciera de forma consistente, se podría asignar a los procesos una u otra escala temporal concreta (un valor para τ) sin alterar en absoluto los resultados numéricos del estudio. Sin embargo este tipo de decisión condicionaría obviamente la magnitud de las constantes cinéticas y la velocidad con la que suceden los procesos. Por ejemplo, dados los valores de la Tabla 4.1, si la unidad de tiempo escogida fuera la hora, la constante cinética k_1 tomaría el valor $100 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que si fuera el segundo, ésta tomaría el valor $100 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esto es importante, ya que los valores de las constantes cinéticas bimoleculares de muchos procesos bioquímicos de asociación de enzimas con sustratos están limitados por la difusión en un rango de órdenes de magnitud próximos a los valores que toman aquí las constantes de segundo orden con la escala temporal de segundos (concretamente, en torno a $1000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Northrup y Erickson, 1992). Pero al considerarse el modelo en un escenario prebiótico, en el que las reacciones serían previsiblemente mucho más lentas, los procesos descritos deberían ocurrir a escalas temporales mayores. En tal caso, unidades de tiempo de horas, días o años serían más realistas. Se volverá a tratar de nuevo este asunto de la escala temporal del sistema en el Capítulo 7 y en la Discusión.

4.2 Ecuación maestra y soluciones estacionarias estocásticas

El comportamiento estocástico de un sistema dinámico suele describirse normalmente mediante la denominada “*ecuación maestra*”. Obtener información sobre el sistema a un determinado tiempo pasa por analizar y resolver dicha ecuación.

Las ecuaciones deterministas presentaban como variables las concentraciones de intermediarios y expresaban su evolución temporal en función de una serie de términos cinéticos, algunos de ellos no lineales (Ecuación 3.3). En cambio, la ecuación maestra estocástica describe la evolución temporal de las probabilidades de que el sistema se encuentre en cada uno de los posibles valores que pueden tomar las poblaciones moleculares de los intermediarios. Así, en realidad se trata de un sistema de tantas ecuaciones diferenciales como estados posibles del sistema. La ecuación para el cambio de la probabilidad de estar en un tiempo t en un estado con un número de moléculas n_i de todos los intermediarios, $P(n_i, t)$, sería:

$$\frac{\partial P(n_i, t)}{\partial t} = \sum_{n_j \neq n_i}^{\infty} \omega(n_j / n_i) P(n_j, t) - \sum_{n_j \neq n_i}^{\infty} \omega(n_i / n_j) P(n_i, t) \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde $\omega(n_j / n_i)$ es la probabilidad de transición por unidad de tiempo de ir al estado de interés n_i desde un estado diferente n_j (con algún intermediario con distinto número de moléculas), y $\omega(n_i / n_j)$ la de que suceda un proceso contrario. Al mismo tiempo, ecuaciones semejantes se plantearían para cada uno de los otros estados de poblaciones n_j posibles. En este caso, si bien los valores posibles de tamaños poblacionales están restringidos a números naturales, no están limitados, y existe por tanto un número infinito de ecuaciones de este tipo. En definitiva, la resolución de la ecuación maestra resulta impracticable y es necesario proceder con aproximaciones.

Como el estudio y resolución analítica de las ecuaciones que describen el comportamiento estocástico suele entrañar gran dificultad incluso con el uso de aproximaciones, más aún en sistemas de semejante envergadura, se suele recurrir con frecuencia a la alternativa de simular la dinámica estocástica. Aquí también el comportamiento del sistema, así como sus posibles estados estacionarios y cuasiestacionarios estocásticos, se explorará a través de simulaciones (apartado a continuación). No obstante, previo a este análisis más detallado, una primera noción del comportamiento del sistema puede obtenerse a partir de la inspección de la ecuación maestra y una breve reflexión sobre las particularidades del modelo.

La ecuación maestra, al ser lineal respecto a las probabilidades de estar en cada estado ($P(n_i, t)$, $P(n_j, t)$, ...), sólo admite una solución estacionaria, es decir una única distribución de probabilidad estacionaria, independientemente de cuales sean las condiciones iniciales²². Aunque por supuesto, esta distribución estacionaria estocástica puede en principio cubrir muy diversos valores del espacio de posibles estados o tamaños poblacionales admisibles para los intermediarios. Por eso es importante distinguir la solución estacionaria estocástica, aquella en la que la distribución de probabilidad no cambia con el tiempo, de las soluciones estacionarias deterministas, que como vimos, se correspondían con valores concretos de concentraciones que no cambiaban con el tiempo. La distribución estacionaria estocástica podrá con frecuencia mostrar varios modos (ser unimodal, bimodal, etc.) dependiendo del número de estados estacionarios hallados por métodos deterministas, quedando cada modo centrado sobre los valores de concentración de cada estado estacionario determinista.

²² Esta afirmación es válida siempre y cuando el sistema en cuestión pueda desplazarse libremente por el espacio fase, es decir, si cualquier valor que puedan tomar las poblaciones moleculares (variables aleatorias) es alcanzable desde cualquier otro estado posible del sistema a través de una cadena de eventos. Pero existen en cambio otro tipo de sistemas que pueden imposibilitar que una solución se alcance a partir de una cierta condición inicial. A efectos ilustrativos, un ejemplo muy sencillo sería el siguiente esquema de reacción: $2X \rightarrow P$. La solución $X=0$ no puede alcanzarse si se parte como condición inicial de un número impar de moléculas de X . En cualquier caso este tipo de comportamiento es bastante infrecuente.

En el caso que nos ocupa, el sistema presenta una barrera absorbente, que corresponde con la extinción de los metabolitos, es decir con tamaños poblacionales iguales a cero. En efecto, tal como se comentó en el capítulo precedente, si todas las concentraciones (o tamaños poblacionales) de intermediarios se hacen cero, el sistema no puede salir del estado trivial, ya que todas las reacciones de síntesis a partir de precursores son bimoleculares y requieren al menos la participación de una molécula de un intermediario. Esto implica que todas las probabilidades de transición por unidad de tiempo de ir de dicho estado trivial n_0 a otro estado n_j son cero, es decir $\omega(n_0/n_j)=0$, luego la expresión de la Ecuación 4.1 aplicada a la barrera absorbente queda reducida a lo siguiente:

$$\frac{\partial P(n_0, t)}{\partial t} = \sum_{n_j \neq n_0}^{\infty} \omega(n_j / n_0) P(n_j, t) \geq 0 \quad \text{Ec. 4.2}$$

Como el sistema además no presenta impedimentos para desplazarse libremente por el espacio posible de valores poblacionales (ver última Nota al pie), esta barrera absorbente puede ser alcanzada desde cualquier lugar del espacio fase, y por tanto la solución estacionaria estocástica es en este caso una distribución unimodal en la que todos los valores de las poblaciones moleculares son cero. Corresponde así plenamente con el estado estacionario determinista trivial.

El razonamiento anterior indica que la única solución final posible (estrictamente, a tiempo infinito) es la extinción. No obstante, para ciertos valores de los parámetros y ciertos tamaños poblacionales podrían existir adicionalmente soluciones cuasiestacionarias (en las que la distribución de probabilidad no cambia prácticamente con el tiempo), que posibiliten que el sistema permanezca un largo periodo de tiempo en estados con poblaciones no nulas antes de alcanzar la barrera absorbente. Este tipo de fenómeno es fundamental para explicar la viabilidad del sistema a grandes escalas temporales. Por eso se ha procedido con un análisis dinámico exhaustivo, mediante simulación, para determinar si existen tales soluciones, y en ese caso, qué características presentan, y en qué condiciones suceden.

4.3 Análisis dinámico estocástico

Todas las simulaciones estocásticas han sido realizadas utilizando el método de Gillespie-Monte Carlo (Gillespie, 1976; 1977), que permite una simulación exacta de la ecuación maestra (Caja 4.1). El método se ha implementado en Matlab y los resultados han sido chequeados paralelamente con ENVIRONMENT (Mavelli et al., 2008; Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010) (ver Material y Métodos).

4.3.1 Condiciones iniciales de simulación

Los valores de concentración de los estados estacionarios hallados mediante el método determinista han servido como referencia para establecer las condiciones iniciales de las simulaciones estocásticas. Como el método de Gillespie utiliza variables discretas, es decir poblaciones moleculares, se ha adaptado el análisis de las concentraciones de intermediarios al estudio de la evolución temporal de las poblaciones moleculares de los diversos metabolitos del sistema. Para ello todas las concentraciones de intermediarios han sido convertidas a número de moléculas²³, con la particularidad de que el modo en que se calcula el número de moléculas n_i de

²³ A lo largo de los próximos apartados, nos referiremos en ocasiones a resultados de concentraciones, o bien indistintamente a resultados de poblaciones moleculares y de concentraciones. Sin embargo no debe llevar a

cada metabolito M_i utilizado como condición inicial de simulación depende del volumen del sistema V .

Con volúmenes suficientemente grandes ($V \geq 10^{-19}$ L), cada tamaño poblacional inicial n_i , se obtiene directamente a partir de la concentración molar inicial deseada $[M_i]$, por aplicación y posterior redondeo de la fórmula:

$$x_i = N_A V [M_i] \quad \text{Ec. 4.3}$$

donde N_A es el número de Avogadro y V el volumen del sistema. El motivo del redondeo se debe a que x_i es habitualmente un número real, y por tanto debe redondearse al valor entero más próximo para obtener el número de moléculas n_i . En estos casos los resultados de cada experimento son fruto de múltiples simulaciones independientes realizadas con la misma condición inicial, es decir, conservando los valores asignados de población molecular de los distintos metabolitos intermediarios.

No obstante, en aquellos experimentos en que el volumen del sistema es muy pequeño ($V < 10^{-19}$ L), los valores resultantes de población inicial son muy pequeños y el redondeo introduce un sesgo demasiado importante en las distintas simulaciones. Por este motivo en estos casos se ha seguido una estrategia alternativa: Para cada intermediario M_i se genera una distribución de Poisson que tiene como media el producto $N_A V [M_i]$, y se asignan valores aleatorios de la distribución como condición inicial de dicho metabolito en las distintas simulaciones independientes. De modo semejante se procede con los metabolitos externos, con la diferencia de que se les asignan valores aleatorios de sus respectivas distribuciones de Poisson no sólo inicialmente, para establecer los tamaños poblacionales de partida, sino a lo largo de toda la simulación. Así, aunque su concentración se considera constante, su población se actualiza en cada paso de simulación. De esta manera se considera implícitamente la difusión de los metabolitos externos, al simularse un reparto aleatorio del pool de moléculas entre los distintos volúmenes de reacción independientes. Aunque este método introduce obviamente mayor variabilidad entre las simulaciones, permite evitar el sesgo del redondeo.

4.3.2 Estados cuasiestacionarios estocásticos

En primer lugar se han analizado las posibles distribuciones cuasiestacionarias estocásticas y la correspondencia de sus modos con los valores de los estados estacionarios estables hallados con la metodología determinista. Para ello se han realizado, para diversos valores de las constantes de degradación k_4 , k_8 , k_{11} , múltiples simulaciones independientes partiendo de las condiciones de concentraciones del estado estacionario determinista inestable calculado para cada caso, evaluando la evolución temporal de las poblaciones de los diversos metabolitos del sistema. En la Figura 4.1 se ilustran como ejemplo los resultados obtenidos para la situación en que $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. Como refleja la evolución temporal de la concentración de ST (Figura 4.1A), a tiempos relativamente cortos dos posibles estados distintos se alcanzan con cierta frecuencia: Por una parte un **estado trivial**, propiamente estacionario, en el que la población de todos los intermediarios se hace cero y el sistema se desvanece (barrera absorbente). Y por otro lado un **estado de coexistencia**, un régimen automantenido en el que la concentración de los distintos metabolitos se mantiene fluctuante en torno al valor de estado estacionario no nulo estable obtenido de forma

confusión: en cualquier caso los resultados de las simulaciones estocásticas se obtienen en términos de tamaños poblacionales (número de moléculas), y es *a posteriori* cuando estos resultados han sido reconvertidos a concentraciones con el fin de mantener un lenguaje común que facilite la comparación con los resultados del análisis determinista.

determinista (para ST, línea discontinua en Figura 4.1A), y en el cual el sistema permanece por un largo periodo de tiempo (aunque éste sea limitado). En la Figura 4.1B se detalla para una de las simulaciones que alcanza el estado de coexistencia, la evolución temporal de las poblaciones de todos los metabolitos, y se comprueba que todos ellos evolucionan hasta alcanzar poblaciones fluctuantes en torno a su valor correspondiente de concentración de estado estacionario estable no nulo determinista (en líneas discontinuas).

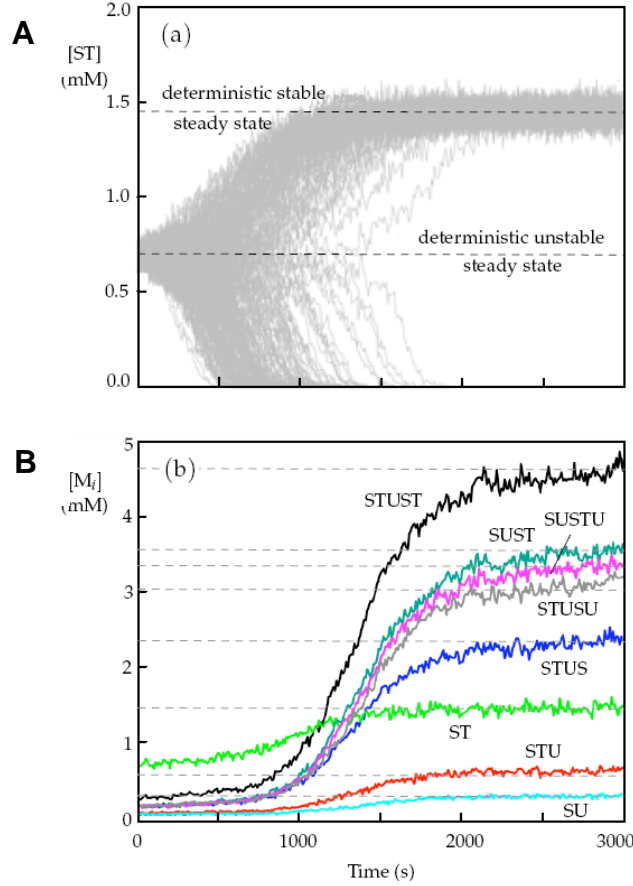


Figura 4.1 Evolución temporal de la concentración de intermediarios. Trescientas simulaciones independientes fueron realizadas para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ y $V = 10^{-18} \text{ L}$, partiendo como condición inicial de los tamaños poblacionales correspondientes a las concentraciones de estado estacionario inestable determinista, un punto silla donde $[STU] = 0.039$, $[STUS] = 0.133$, $[STUST] = 0.244$, $[ST] = 0.691$, $[SU] = 0.021$, $[SUST] = 0.136$, $[SUSTU] = 0.125$, $[STUSU] = 0.137 \text{ mM}$ (ver Tabla 3.2). (A) Resumen de la evolución temporal de la concentración de ST obtenida en las distintas simulaciones. Aproximadamente la mitad de las simulaciones terminan en un estado de coexistencia con poblaciones no nulas de intermediarios, y la otra mitad en el estado trivial, por lo que la condición inicial de estado estacionario inestable determinista se sitúa próxima a la línea de isoprobabilidad 50%. (B) Detalle de la evolución temporal de la concentración de los distintos intermediarios obtenida en una de las simulaciones que terminan en el estado no nulo de coexistencia. En líneas discontinuas se representan los valores de concentración de estado estacionario calculados con el método determinista. Se observa que tras un tiempo suficientemente largo, las concentraciones fluctúan en torno a un valor promedio constante, coincidente con las concentraciones del estado estacionario determinista.

Entre ambos estados existe una cierta región en el espacio fase para la cual los valores de los tamaños poblacionales de intermediarios son particularmente inestables, que explica que el sistema evolucione alternativamente con cierta probabilidad hacia uno u otro estado. A diferencia del estudio determinista, no existe una barrera separatriz asociada a un punto silla, sino que aparece una gradación de zonas (o superficies) de isoprobabilidad de ir a un estado u otro a

tiempos relativamente cortos. Esto explica que en la región próxima a los valores de estado estacionario determinista inestable (el punto silla), con frecuencia suceda que a partir de iguales condiciones iniciales las simulaciones se alejen hacia estados distintos. Concretamente, como se observa en la Figura 4.1A, para la condición inicial de estado estacionario inestable determinista, aproximadamente la mitad de las simulaciones terminan en el estado estacionario estocástico (extinción) y la otra mitad en el estado de coexistencia, ya que el estado estacionario determinista inestable está muy próximo a la zona de equiprobabilidad (isoprobabilidad 50%) de ir a un estado u otro. En definitiva, la presencia de una zona intermedia tan inestable posibilita que el sistema adquiera una distribución cuasiestacionaria bimodal, en la que cada modo está centrado sobre cada uno de los estados estables deterministas. Pero lógicamente, la contribución de cada modo dependerá de la condición inicial de simulación. ¿Qué sucede para otras condiciones de partida?

4.3.3 Dependencia de condiciones iniciales

A diferencia del análisis determinista, en el que dada una determinada condición inicial de partida el sistema siempre evoluciona hacia un mismo estado, en el tratamiento estocástico el comportamiento debe referirse en términos probabilísticos. Es decir, partiendo de unas determinadas condiciones iniciales, ¿cuál es la probabilidad de ir a un determinado estado? La frecuencia con la que el sistema evoluciona bien al estado estacionario trivial o al estado de coexistencia varía dependiendo de lo lejos que se encuentren las condiciones iniciales de las concentraciones correspondientes a la solución de estado estacionario inestable determinista. La Figura 4.2 ilustra para varias condiciones de k_1 , k_8 , k_{11} , la frecuencia de llegada al estado de coexistencia obtenida con 300 simulaciones independientes realizadas para múltiples condiciones iniciales de cebado. A medida que las concentraciones o tamaños poblacionales iniciales empleados se hacen disminuir por debajo de los valores del estado estacionario inestable determinista, la probabilidad de alcanzar finalmente el estado de coexistencia decrece. Por el contrario, concentraciones iniciales superiores a aquellas del estado estacionario determinista inestable son más favorables para la nucleación del sistema, y entonces la probabilidad de alcanzar el estado de coexistencia es mayor.

Se observa que el sistema es altamente capaz de construirse, ya que el estado de coexistencia se puede alcanzar con cierta probabilidad incluso con cantidades iniciales muy inferiores a las características del estado estacionario determinista inestable. Por ejemplo, para $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.1 \tau^{-1}$, el sistema presenta un 5% de probabilidades de autoconstruirse cuando dispone de concentraciones iniciales de tan sólo 0.3 veces las correspondientes al estado estacionario inestable determinista. Por tanto, a diferencia del tratamiento determinista, en el que carece de sentido hablar de probabilidades de alcanzar uno u otro estado, ya que cualquier conjunto de concentraciones mínimamente inferiores a las del estado estacionario determinista inestable conducen inexorablemente a la extinción del sistema (es decir, existe una concentración inicial “crítica” relacionada con la barrera separatriz), las fluctuaciones del análisis estocástico permiten ampliar el rango de valores iniciales admisible para la autoconstrucción.

Resulta interesante estudiar cómo es a largo plazo la distribución de las poblaciones de metabolitos de las distintas muestras independientes según la condición inicial utilizada. Tras un tiempo suficientemente largo (3000τ), las distribuciones se vuelven cuasiestacionarias, adquiriendo, cuando las concentraciones iniciales son próximas a los valores de estado estacionario determinista inestable, un carácter bimodal característico del predominio de sistemas entre ambos estados: el de coexistencia y el estacionario trivial. Como ejemplo, la Figura 4.3 muestra la distribución de la población de moléculas de ST obtenida a tiempo 3000τ para varias condiciones iniciales y dos situaciones distintas de k_1 , k_8 , k_{11} . De nuevo se observa que a medida que las

concentraciones iniciales de simulación se alejan de los valores de estado estacionario determinista inestable, las proporciones en uno y otro estado cambian²⁴. No obstante, la condición inicial no altera las características de los estados finales alcanzados: el conjunto de valores de población de ST en el estado de coexistencia (ver por ejemplo la Figura 4.3A, a la derecha) mantiene la misma distribución, con la misma dispersión y valor promedio independientemente de la condición de partida utilizada.

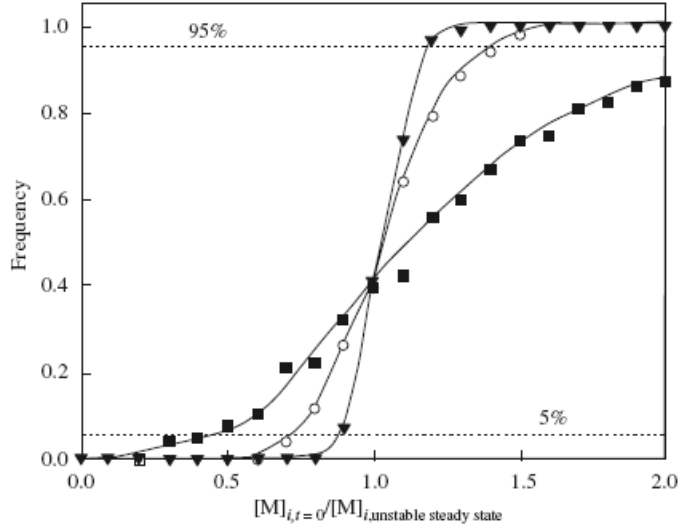


Figura 4.2 Diagrama de frecuencias relativas con las que se alcanza el estado de coexistencia para distintas condiciones iniciales. Cada punto representa la frecuencia relativa con la que se alcanza (tras 3000 τ) el estado no nulo de coexistencia a partir de 300 simulaciones independientes que parten de las condiciones iniciales indicadas en abscisas. La concentración inicial de cada metabolito $[M]_{t=0}$ se ajusta en la misma proporción que el resto respecto a su valor en estado estacionario inestable determinista $[M]_{i,unstable}$, y se expresa en abscisas en términos relativos a éste. En líneas discontinuas, isoprobabilidad del 95% y del 5% de alcanzar el estado de coexistencia. Las distintas curvas representan diversas condiciones de las constantes de degradación: $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ (triángulos), $0.2 \tau^{-1}$ (círculos), $0.1 \tau^{-1}$ (cuadrados)²⁵. En todos los experimentos, el volumen $V = 10^{-18}$ L. Resultados semejantes se obtienen tras periodos más largos de simulación (6000 τ).

Las propiedades de la distribución en torno al estado de coexistencia son semejantes a tiempos más largos (6000 τ). Siempre y cuando el sistema se mantenga en condiciones de los parámetros alejadas de puntos críticos, este estado resulta cuasiestacionario, y por tanto metaestable. Debe señalarse además que en tales circunstancias el sistema se comporta como cuasiérgódico alrededor del estado de coexistencia: todos los valores de tamaño poblacional situados en torno a dicho estado son explorados con probabilidad no nula tras un tiempo suficientemente largo. Por eso la misma distribución de coexistencia obtenida a partir de la

²⁴ Puede incluso suceder, si las condiciones son muy favorables (ver por ejemplo Figura 4.3B, en rojo), que se obtenga una distribución cuasiestacionaria unimodal, en la que todas las simulaciones se mantienen fluctuantes en torno al estado de coexistencia. O en el extremo contrario, si las condiciones son muy restrictivas (ver por ejemplo Figura 4.3B, en azul), que se alcance directamente la distribución estacionaria (es decir una distribución unimodal sobre el estado trivial, de extinción total) sin pasar por un estadio intermedio de distribución cuasiestacionaria bimodal.

²⁵ La diferencia que se observa en la pendiente de las tres curvas no tiene un significado relevante, ya que responde al hecho de que las pendientes están condicionadas por el valor concreto que toma en cada caso el estado estacionario inestable (variable en el eje de abscisas); por ejemplo para $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ éste valor es mayor, y por tanto la curva muestra una pendiente más pronunciada.

población de ST de distintas muestras a un determinado tiempo, se reproduce al considerar en un intervalo de tiempo razonablemente largo la distribución de valores poblacionales de ST de una sola de las simulaciones independientes.

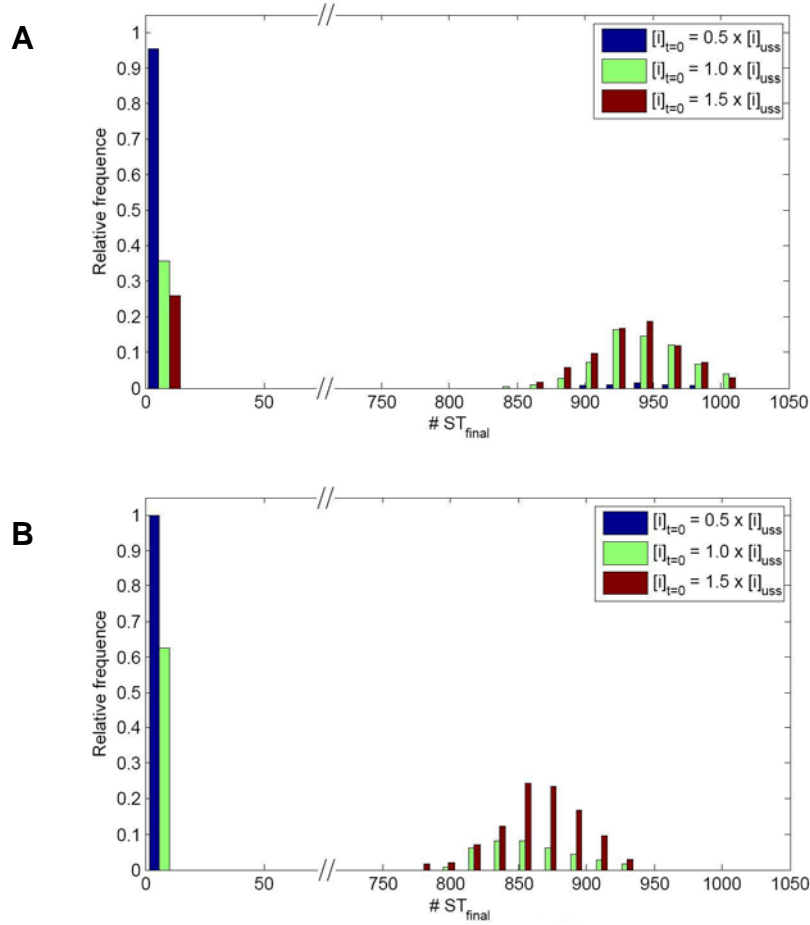


Figura 4.3 Histograma de la distribución del número de moléculas de ST tras un tiempo suficientemente largo (3000τ). 300 simulaciones independientes fueron realizadas con cada condición inicial, representándose la frecuencia relativa con la que la población de ST alcanza distintos estados (distinto número de moléculas). Se muestran los resultados obtenidos con tres condiciones iniciales distintas: tamaños poblacionales de metabolitos M_i que corresponden a las concentraciones de estado estacionario inestable determinista $[M_i]^{\text{uss}}$ (verde), a $0.5[M_i]^{\text{uss}}$ (azul), y a $1.5[M_i]^{\text{uss}}$ (rojo). (A) $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.1 \tau^{-1}$. (B) $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. En todos los experimentos el volumen V es 10^{-18} L. Distribuciones semejantes, con ligeras diferencias en las frecuencias, fueron obtenidas a tiempos más largos (6000τ).

La distribución en torno al estado de coexistencia sí está condicionada por el volumen del sistema considerado, que concretamente determina su dispersión, es decir, la anchura de la distribución, como se tratará más extensamente en el Apartado 4.3.6. A su vez, el valor que adquiere dicho estado de coexistencia en el espacio fase del tamaño poblacional de ST depende de los parámetros cinéticos del modelo. Nótese que a medida que aumentan los valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$ (al pasar de la Figura 4.3A a la Figura 4.3B), la distribución en torno al estado de coexistencia se desplaza hacia valores menores de población de ST, del mismo modo que disminuía el valor de concentración de estado estacionario de ST en el análisis determinista conforme aumentaban las constantes de degradación (ver Figura 3.7).

4.3.4 Restricciones cinéticas al automantenimiento

Con objeto de analizar las restricciones cinéticas y profundizar en el efecto de los valores de las constantes cinéticas de degradación sobre el comportamiento estocástico del sistema, se ha elaborado un *diagrama de bifurcación estocástico*: un diagrama que describe las probabilidades de alcanzar los estados alternativos posibles para distintos valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$. Para ello, el valor promedio y desviación típica en el estado no trivial de coexistencia (obtenidos de la distribución a un tiempo suficientemente largo en los experimentos de la Figura 4.3), así como aquellos valores iniciales de concentración para los que se obtiene una probabilidad del 95% y 5% de alcanzar el estado de coexistencia (obtenidos del experimento de la Figura 4.2), han sido recopilados para las distintas condiciones de k_4 , k_8 , k_{11} y representados sobre el diagrama de bifurcación determinista (Figura 4.4). Las curvas de isoprobabilidad 95% y 5% son indicativas del rango de concentraciones para el cual el comportamiento del sistema es más sensible. Pequeñas perturbaciones en esta zona alteran mucho la probabilidad de que el sistema se comporte recuperándose o extinguiéndose.

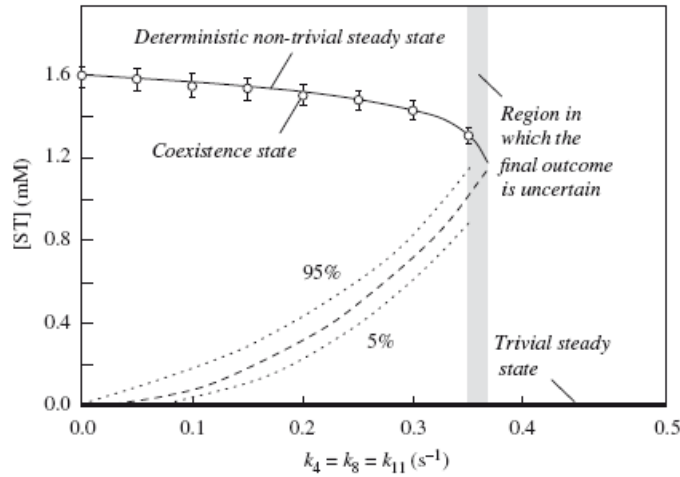


Figura 4.4 Diagrama de bifurcación estocástico. Se observan dos zonas bien diferenciadas en el espacio de parámetros: Para valores relativamente bajos de $k_4 = k_8 = k_{11}$, el estado estacionario trivial (línea negra continua) coexiste con un estado no nulo de coexistencia. Éste último se describe como la distribución de valores de $[ST]$ obtenidos tras 3000τ con múltiples simulaciones realizadas para $V = 10^{-18}$ L sobre el estado estacionario no nulo estable determinista, y se representa como media \pm desviación típica (círculos con barras verticales). Se comprueba que sus valores se mantienen en torno a las concentraciones de estado estacionario determinista (curva continua). Aunque no existe propiamente biestabilidad estocástica, el sistema puede mantenerse con una distribución cuasiestacionaria durante un largo periodo de tiempo. Ambos estados están separados por una cierta región de incertidumbre, situada alrededor de los valores del estado estacionario determinista inestable (línea discontinua): las curvas de isoprobabilidad 95% y 5% de alcanzar el estado de coexistencia, obtenidas de experimentos semejantes a los de la Figura 4.2, se sitúan por encima y por debajo de dicho estado, respectivamente (líneas punteadas). Conforme las constantes de degradación se aproximan al punto crítico determinista ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367 \tau^{-1}$), va resultando más difícil precisar el comportamiento a tiempos razonablemente cortos y poder caracterizar los valores de isoprobabilidad 95% y 5% y el propio estado de coexistencia, que se vuelve bastante más inestable (rango gris). Cuando $k_4 = k_8 = k_{11} \geq 0.367 \tau^{-1}$ no es posible que el sistema se mantenga en ningún estado que no sea la solución trivial, en la que todas las concentraciones y flujos son cero: el sistema colapsa.

Se observa que existe un amplio rango de valores de las constantes de degradación que permite la coexistencia del estado estacionario trivial y del estado (transitorio) no trivial o de coexistencia, coincidiendo con la región de biestabilidad determinista. Ambos estados se encuentran separados por una cierta región particularmente inestable de incertidumbre (donde se

encuentran las curvas de isoprobabilidad 95% y 5%)²⁶, que posibilita temporalmente el dominio del estado de coexistencia, manteniéndolo alejado del espacio fase de mayor atracción del estado estacionario trivial, que es el único propiamente estable. Sin embargo, conforme las constantes de degradación aumentan, la región de incertidumbre se aproxima al estado de coexistencia y disminuye la capacidad de automantenimiento, especialmente porque las fluctuaciones asociadas a pequeños volúmenes suponen con mayor probabilidad un escape de dicho estado hacia concentraciones menores que conducen antes al estado estacionario trivial. Precisamente la región sombreada en gris en la Figura 4.4 da cuenta de la dificultad que existe para precisar el comportamiento a tiempos relativamente largos cuando los valores de k_4 , k_8 y k_{11} son próximos a 0.367. Finalmente, si las constantes de degradación son suficientemente altas ($k_4 = k_8 = k_{11} \geq 0.367 \tau^{-1}$), resulta ya imposible el mantenimiento temporal del sistema en un estado de coexistencia de poblaciones no nulas, y tal como sucede en el estudio determinista por encima del punto crítico de bifurcación, el sistema colapsa rápidamente en la solución trivial, es decir, el sistema se extingue.

Es importante resaltar de nuevo que a diferencia del caso determinista, el comportamiento estocástico está regido por probabilidades. De ahí la imposibilidad de precisar, cuando se parte de condiciones de estado de coexistencia, un valor concreto límite de k_4 , k_8 , k_{11} para el que se produce la extinción a un determinado tiempo. El límite es probabilístico, y por tanto depende fuertemente de la importancia relativa de las fluctuaciones (volumen del sistema). Conviene recordar además que el comportamiento descrito en la Figura 4.4 sólo es válido considerando tiempos relativamente cortos, pues como es obvio, a un tiempo suficientemente largo el sistema terminará siempre colapsando independientemente de los parámetros cinéticos, según se ha explicado en el Apartado 4.2.

4.3.5 Tiempo de recuperación y de extinción

Una vez ya descrita de manera determinista la robustez dinámica del sistema frente a la pérdida catastrófica de ciertos de sus metabolitos (Apartado 3.4.5), se ha diseñado una batería de experimentos de simulación estocástica para valorar cómo afectan las fluctuaciones derivadas del ruido interno al comportamiento del sistema ante situaciones comprometedoras de concentración de sus constituyentes. La evolución temporal de las poblaciones de intermediarios, bien hacia la recuperación o hacia la extinción, ha sido analizada para múltiples simulaciones independientes, con diversas condiciones de k_4 , k_8 , k_{11} y diversos volúmenes del sistema, manteniendo como condición inicial de cada experimento aquellos valores correspondientes a las concentraciones de estado estacionario inestable determinista. En la Figura 4.5 se muestra como ejemplo los resultados obtenidos para $V = 10^{-19}$ L y $V = 10^{-17}$ L cuando $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$.

Como es razonable, se observa que las concentraciones están sujetas a mayores fluctuaciones en el caso de los volúmenes más pequeños ($V = 10^{-19}$ L), puesto que contienen un menor número de moléculas para concentraciones equivalentes. Más interesante es el hecho de que la respuesta, bien hacia la recuperación o hacia la extinción, sea más rápida en los volúmenes pequeños (ver por ejemplo el desfase que existe entre la evolución temporal de [ST] para $V = 10^{-19}$ L y para $V = 10^{-17}$ L a la izquierda de la Figura 4.5). Probablemente esto se deba a que fluctuaciones mayores contribuyen inicialmente más a que el sistema escape rápido de condiciones cercanas al estado estacionario determinista inestable, de manera que reducen el lapso de tiempo

²⁶ Las curvas de isoprobabilidad han sido construidas a partir de los valores de [ST] que corresponden a aquellas condiciones iniciales que en los experimentos de la Figura 4.2 producían frecuencias relativas de 0.95 y 0.05 de ir al estado de coexistencia.

que habitualmente éste requiere para alejarse de esta región en uno u otro sentido. Conviene recordar que la condición inicial tiene naturaleza de estado estacionario determinista, y que por tanto el sistema permanecería en él indefinidamente en ausencia alguna de perturbaciones (en el límite determinista).

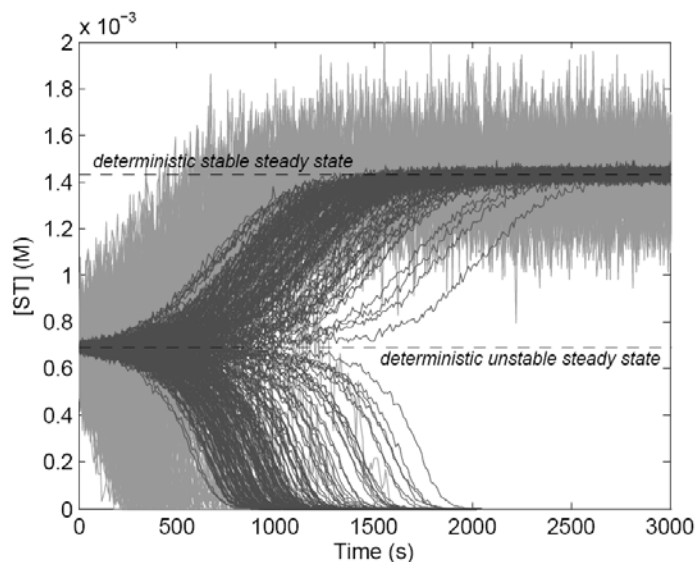


Figura 4.5 Evolución temporal de la concentración del intermediario ST para dos volúmenes distintos del sistema: $V = 10^{-19}$ L (líneas grises claras) y $V = 10^{-17}$ L (líneas grises oscuras). En cada caso se realizaron 300 simulaciones independientes partiendo de poblaciones moleculares de intermediarios correspondientes a los valores de concentraciones de estado estacionario determinista inestable (valores en el pie de Figura 4.1). En todos los casos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. La evolución temporal para $V = 10^{-18}$ L, en las mismas condiciones, se muestra en la Figura 4.1A y en la Figura 4.8B de la Caja 4.2.

El tiempo de respuesta de las curvas de evolución temporal también se ha evaluado de manera cuantitativa²⁷, a través del cálculo de los tiempos característicos T_c de recuperación y extinción de las diversas poblaciones de intermediarios, como se detalla en la Caja 4.2. La Tabla 4.2 resume los resultados obtenidos para STU, ST y SU con dos volúmenes diferentes del sistema y dos valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$.

Independientemente de los valores de las constantes cinéticas de degradación, la disminución del volumen del sistema supone una reducción de los tiempos característicos de recuperación y de extinción de todos los intermediarios. Así, se comprueba que los tiempos característicos dependen del tamaño del sistema: cuanto menor es el volumen, más rápida la evolución bien hacia el estado de coexistencia o la solución trivial. Por otra parte, considerando volúmenes equivalentes, los tiempos característicos para la situación de $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.2 \tau^{-1}$ son menores que los correspondientes a $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$, reflejando como es razonable la influencia de otros factores cinéticos intrínsecos (por ejemplo, una menor degradación puede favorecer una recuperación de los catalizadores más rápida).

²⁷ Medir con rigor tiempos de respuesta en curvas de evolución temporal, aun en ausencia total de ruido, no es una tarea sencilla. Basta señalar que es común que el sistema evolucione en varias fases, que lo haga con oscilaciones, que alcance la solución final de modo asintótico... El problema se agrava si además existe ruido, como es el caso. Existen diversas metodologías que pueden adaptarse mejor o peor dependiendo del tipo de problema. Aquí se aplica a curvas estocásticas el método determinista de cálculo de tiempos característicos (Lloréns et al., 1999), ya que se adapta bien a muy diversos tipos de curvas y evita en gran medida el sesgo que se produce al comparar tiempos en curvas con distinta forma.

Tabla 4.2 Tiempos característicos T_c para la recuperación y la extinción del sistema. Para cada valor de $k_4 = k_8 = k_{11}$ y cada volumen, 300 simulaciones independientes han sido realizadas, con condiciones iniciales de concentraciones de estado estacionario determinista inestable. Los valores de T_c (en unidades arbitrarias, τ) han sido calculados por separado para aquellas simulaciones que alcanzan el estado no trivial de coexistencia (recuperación) y para aquellas que alcanzan el estado trivial estacionario (extinción).

Proceso	Especie	$k_4 = k_8 = k_{11} = 0.2 \text{ s}^{-1}$		$k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ s}^{-1}$	
		$V = 10^{-18} \text{ L}$	$V = 10^{-17} \text{ L}$	$V = 10^{-18} \text{ L}$	$V = 10^{-17} \text{ L}$
Recuperación	STU	871 (791;973)	1054 (966;1156)	1172 (1061;1298)	1382 (1249;1519)
	ST	550 (473;644)	730 (644;829)	808 (705;914)	1024 (895;1152)
	SU	912 (834;1005)	1091 (1006;1192)	1200 (1094;1319)	1411 (1282;1544)
Extinción	STU	265 (146;283)	443 (338;533)	451 (328;558)	686 (575;804)
	ST	261 (196;350)	477 (378;597)	516 (408;654)	764 (654;886)
	SU	226 (159;296)	473 (367;588)	472 (360;584)	730 (610;844)
Recuperación (%)		27	45	29	42

* Los valores de T_c se presentan como $T_{c,q2}(T_{c,q1}; T_{c,q3})$, donde $T_{c,q2}$ es el T_c de la curva de evolución temporal de la mediana muestral de cada conjunto de simulaciones, y $T_{c,q1}$ y $T_{c,q3}$ los correspondientes a los cuartiles 1^{ero} y 3^{ero} respectivamente. En la última fila se muestra la frecuencia de simulaciones que alcanzaron el estado de coexistencia con cada condición.

4.3.6 Estabilidad global y volumen crítico

El análisis estocástico realizado hasta ahora permite considerar la viabilidad del sistema en un rango relativamente amplio del espacio de parámetros, ya que sugiere que es capaz de permanecer en el estado de coexistencia durante largos periodos de tiempo aun en presencia de moderadas fluctuaciones asociadas al ruido interno siempre que los valores de las constantes cinéticas de degradación sean suficientemente bajos. En tales circunstancias el estado de coexistencia se encuentra tan alejado del dominio de máxima atracción del estado estacionario trivial, que en la práctica se contempla como indefinidamente estable, es decir, como un régimen automantenido. En este sentido el comportamiento general es parecido al obtenido con el análisis determinista. Sin embargo, al margen de las constantes cinéticas de degradación, no se ha contemplado específicamente hasta ahora cuál es la influencia del volumen, un factor que debe ser decisivo también en la estabilidad global del sistema en funcionamiento. Así como en el límite determinista el sistema en el estado de coexistencia no pelagra, es inevitable que volúmenes muy bajos provoquen fluctuaciones suficientes para traspasar la región de predominio de éste y desmantelar por completo el sistema. Por este motivo es de esperar que exista un volumen del sistema crítico (V_c) por debajo del cual esta transición se vuelva muy probable dentro de un cierto periodo corto de tiempo.

Se han planteado varios experimentos con diversos volúmenes del sistema, realizando en cada caso múltiples simulaciones independientes a partir de condiciones iniciales lo más próximas posible a las concentraciones de estado estacionario no nulo estable determinista. Concretamente, para volúmenes grandes ($V \geq 10^{-19} \text{ L}$) el tamaño de población inicial de cada metabolito en las distintas simulaciones fue el mismo y se asignó por redondeo al número de moléculas más próximo a la concentración de dicho estado. En cambio, para aquellos volúmenes pequeños del sistema ($V < 10^{-19} \text{ L}$), la población inicial de metabolito en cada simulación se asignó escogiendo un valor aleatorio de una distribución de Poisson centrada en el valor correspondiente a la concentración de

estado estacionario estable no nulo determinista – ver Apartado 4.3.1. Para cada valor de volumen, la evolución temporal de las poblaciones moleculares en las distintas simulaciones ha sido analizada durante un tiempo relativamente largo de simulación (6000τ). La Figura 4.6 muestra por ejemplo los resultados obtenidos en la concentración de ST con varios volúmenes del sistema para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$.

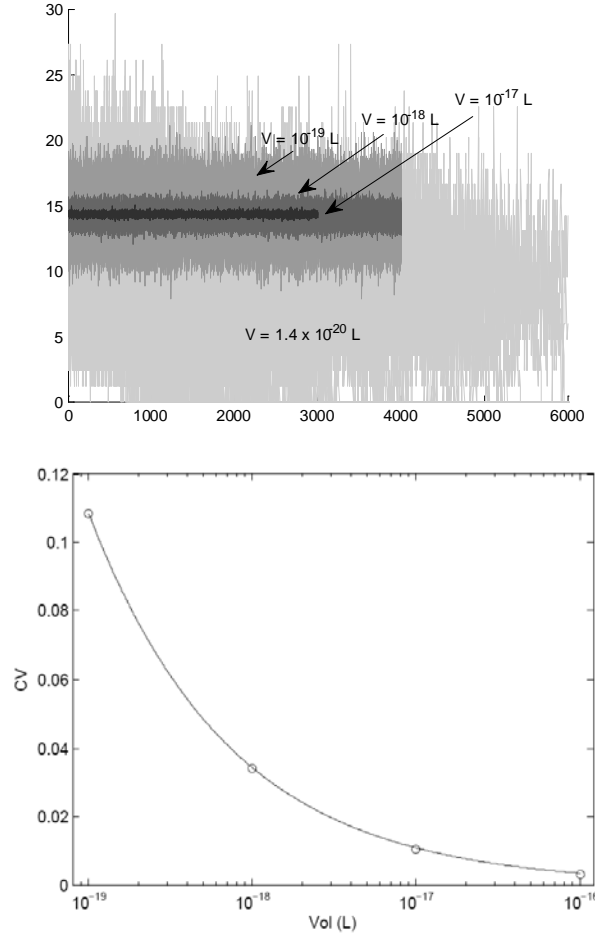


Figura 4.6 Efecto del tamaño poblacional sobre el comportamiento dinámico en torno al estado de coexistencia. Se muestra para varios volúmenes la evolución temporal de la concentración de ST obtenida con múltiples simulaciones independientes partiendo de condiciones lo más cercanas posible a las concentraciones del estado estacionario determinista no trivial estable. En todos los casos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. A volúmenes muy bajos (bajas poblaciones moleculares) el sistema colapsa. A volúmenes mayores se mantiene en un estado de coexistencia, con concentraciones de ST fluctuantes alrededor de su valor de estado estacionario determinista. En el inserto se detalla para estos últimos casos el efecto del tamaño poblacional sobre la magnitud de las fluctuaciones en torno al estado de coexistencia: El coeficiente de variación obtenido en cada volumen con los valores de concentración de ST de las distintas simulaciones a tiempo 6000τ (CV_{ST}) escala de modo inverso con el tamaño del sistema, siguiendo la función $CV_{ST} = a V^{1/2}$ ($a = 3.43 \times 10^{-11}$; $R^2 = 0.99$). El mismo principio es válido si se analiza el coeficiente de variación de la concentración en una sola simulación a distintos tiempos, de acuerdo con un comportamiento cuasi-ergódico del sistema. Lógicamente, una función de ajuste semejante se obtendría si se representara en abscisas el tamaño poblacional en lugar del volumen, ya que ambos son proporcionales para una misma concentración.

Se observa que a volúmenes relativamente grandes las poblaciones se mantienen durante todo el tiempo de estudio fluctuantes en torno al estado de coexistencia. Al igual que sucediera con los experimentos de la Figura 4.5, la magnitud de las fluctuaciones obtenida en torno al estado

de coexistencia es mayor conforme disminuye el volumen del sistema considerado, es decir cuanto menor sea el tamaño poblacional de intermediarios que corresponde a la concentración inicial requerida de estado estacionario determinista. Pero además, se deduce un principio interesante: siempre que el volumen es lo suficientemente grande, el sistema se comporta como cuasiérgico alrededor del estado de coexistencia y se cumple que la magnitud de las fluctuaciones estocásticas alrededor de dicho estado escala de manera inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tamaño poblacional²⁸ (Figura 4.6, inserto). Sin embargo, cuando el volumen es muy pequeño, el sistema es incapaz de permanecer ya apenas en el estado de coexistencia, pues las altas fluctuaciones provocan que las poblaciones de intermediarios abandonen rápidamente dicho estado (antes de 6000τ) y se dirijan al estado estacionario trivial.

El análisis anterior se ha extendido a múltiples volúmenes, representándose el valor que toma en cada caso la media muestral de concentración de ST a un tiempo final de 6000τ (Figura 4.7), y queda patente la existencia de un cierto volumen crítico V_c que es necesario superar para que el sistema se automantenga. Concretamente, para las condiciones de $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ el V_c se sitúa aproximadamente en el rango de valores 1.4 a 4×10^{-20} L (Figura 4.7, franja gris). Para $V < 1.4 \times 10^{-20}$ L las concentraciones de todos los intermediarios colapsan rápidamente, y por eso la concentración de ST obtenida es nula, a diferencia de volúmenes mayores ($V > 4 \times 10^{-20}$ L) para los que se conservan valores promedio alrededor de la concentración de estado estacionario determinista no nulo estable. Un comportamiento semejante se obtiene al analizar la mediana muestral o la moda muestral.

Debe señalarse que existe un rango intermedio de volúmenes próximos al V_c descrito (comprendidos entre 1.4 y 4×10^{-20} L, en la franja gris) que presentan a 6000τ valores de concentración de ST intermedios. En cualquier caso estos valores no corresponden con estados cuasiestacionarios de coexistencia sino que son simplemente reflejo de distintas concentraciones transitorias por las que pasan los metabolitos en un proceso lento de deterioro progresivo del sistema. Como muestra la Figura 4.7, estas concentraciones disminuyen al considerar tiempos de simulación mayores (18000τ). Se tratan por tanto de condiciones para las que el sistema tarda más tiempo en colapsar. ¿Significa esto que a medida que se dispone de información a tiempos más largos se puede determinar con mayor precisión un valor crítico V_c ? Dicho de otro modo, ¿se puede conseguir de esta manera estrechar la franja gris de la Figura 4.7 y acotar un punto para el que suceda una transición brusca en los valores de concentración de ST?

Lo cierto es que el tiempo de simulación no sólo afecta al límite izquierdo del V_c presentado en la Figura 4.7, sino también al margen derecho, ya que a medida que se consideran tiempos mayores la probabilidad de extinción en volúmenes más grandes se vuelve no despreciable. Empezarán por tanto a disminuir los valores promedio de concentración de ST en ciertos volúmenes que a tiempos más cortos permitían el mantenimiento de las concentraciones alrededor de los valores del estado estacionario determinista no nulo estable²⁹. De hecho, en el caso extremo

²⁸ Este principio alométrico es característico de los sistemas ergódicos y sirve como prueba de la naturaleza cuasiérgica del sistema alrededor del estado de coexistencia cuando el volumen considerado es suficientemente grande. Lógicamente, se deja de cumplir cuando el sistema está próximo a puntos críticos (es decir cerca del valor límite de $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.367 \tau^{-1}$ o para volúmenes demasiado pequeños), ya que entonces el sistema cae con mucha facilidad en el dominio de atracción del estado trivial y se diluye el carácter metaestable del estado de coexistencia: el sistema es incapaz de mantener una distribución bimodal a tiempos relativamente largos.

²⁹ En cualquier caso el tiempo necesario para observar fenómenos completos de extinción en volúmenes superiores a 3×10^{-20} L debe ser extremadamente alto, ya que en estos casos no se ha detectado ni un solo caso de extinción en las 300 simulaciones independientes tras un tiempo de 12000τ . Es computacionalmente

en que $t \rightarrow \infty$, la extinción será segura para cualquier volumen del sistema, ya que el estado trivial de concentraciones nulas de intermediarios es la única solución estacionaria estocástica posible. Con este razonamiento queda claro que el valor de volumen crítico³⁰ está supeditado a la escala de tiempo considerada, y cabe cuestionar la validez del valor hallado de V_c en un contexto más amplio, para otras escalas de tiempo.

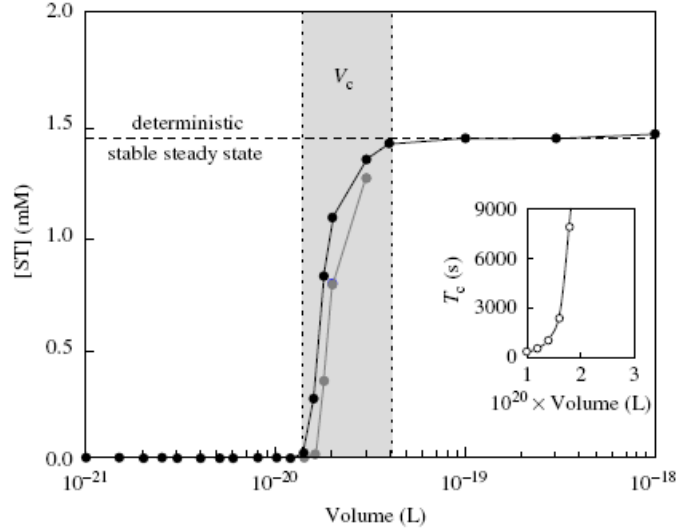


Figura 4.7 Efecto del tamaño finito de población sobre la estabilidad global del sistema. Para cada valor de volumen, múltiples simulaciones independientes se realizaron partiendo de condiciones iniciales correspondientes a las concentraciones del estado estacionario determinista no trivial estable (corrigiendo el sesgo en tamaños pequeños con una distribución de Poisson: ver Apartado 4.3.1). El valor de la media muestral de la concentración de ST a tiempo 6000τ se muestra en función del volumen (puntos negros). Se obtiene un volumen crítico V_c en el rango $1.4 - 4 \times 10^{-20}$ L (área sombreada) por debajo del cual es imposible el mantenimiento en el estado de coexistencia y el sistema colapsa. Para los volúmenes intermedios el análisis se ha extendido a 18000τ (puntos grises), observándose una disminución general de los valores de $[ST]$ que indica que a tiempos progresivamente mayores el valor crítico se desplaza hacia la derecha. No obstante, en el inserto se muestra cómo el tiempo crítico T_c de extinción correspondiente a la curva de la mediana muestral de concentración de ST a cada volumen escala de modo muy pronunciado con el tamaño del sistema. El ajuste ($R^2 = 0.99$) corresponde a una función potencial del tipo $T_c = aV^b + c$ (donde $a = 2 \times 10^{183}$, $b = 9.087$, $c = 246$). En todos los experimentos $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$.

Precisamente, con objeto de comprender mejor³¹ cómo depende la probabilidad de extinción del tamaño del sistema, y desentrañar así la relación existente entre el tiempo de

costoso continuar estas simulaciones durante tiempos mucho más largos, por lo que la Figura 4.7 no incluye valores de $[ST]$ a 18000τ para estos volúmenes.

³⁰ Con el razonamiento anterior se demuestra que no existe un valor de volumen crítico, *sensu stricto*. Ahora bien, puesto que el volumen sigue siendo determinante en la probabilidad de mantenimiento del sistema a tiempos suficientemente largos, el término puede aplicarse en un sentido más amplio probabilístico para referirse a la región de valores de volumen para los que se detecta el mayor cambio en la probabilidad de extinción a un determinado tiempo.

³¹ En principio, se podría haber previsto un comportamiento exponencial. La probabilidad de extinción en un cierto tiempo depende principalmente del número de pasos que separan los valores de población en el estado estacionario determinista no trivial estable (ns) de los valores en el estado estacionario determinista no trivial inestable (nu). Si denomináramos $\omega(i/i-1)$ a la probabilidad de transición por unidad de tiempo entre estados inmediatamente próximos, se podría describir la probabilidad de extinción Ω para un cierto volumen de referencia como la probabilidad de que suceda toda una cadena de eventos: $\Omega = \prod_{i=ns}^{nu} \omega(i/i-1)$. Suponiendo que todos esos eventos fueran equiprobables: $\Omega = \prod_{i=ns}^{nu} \omega(i/i-1) \approx \omega^{ns-nu}$. Ahora bien, puesto que la

simulación y el valor esperable de V_c , se ha procedido a analizar el tiempo necesario para la extinción en cada uno de los volúmenes de los experimentos anteriores cercanos al V_c descrito. Concretamente, para cada volumen del rango 1 a 3×10^{-20} L se ha evaluado el tiempo característico T_c de extinción de la curva de evolución temporal de la mediana muestral de [ST]. Como se observa en el inserto a la Figura 4.7, el T_c escala de modo muy pronunciado con el volumen del sistema. La función potencial de ajuste predice por ejemplo un T_c de $10^{10} \tau$ para un volumen tan pequeño como 10^{-19} L. Esta cifra significaría un tiempo necesario para la extinción de alrededor de 1000 años en un hipotético caso en que se considerara como unidad de tiempo el segundo, pero un valor todavía mayor si τ representara una unidad de tiempo superior. En definitiva, el tiempo medio necesario para que un sistema de tamaño medio se extinga aumenta tan abruptamente conforme se incrementa el volumen, que alcanzará órdenes de magnitud enormes sin apenas desplazar el límite superior de V_c antes predicho. Esta observación permite preservar la noción de un cierto volumen crítico a escalas de tiempo razonables, y postular la validez del límite aproximado hallado ($\sim 4 \times 10^{-20}$ L) en una escala de tiempo química (de procesos prebióticos).

El comportamiento descrito hasta ahora con las condiciones de $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ también es aplicable a otros valores de los parámetros cinéticos, aunque por supuesto el valor concreto del volumen crítico cambiará. En particular, a medida que las constantes de degradación $k_4 = k_8 = k_{11}$ disminuyen, el valor de V_c decrece también, ya que la región de mayor inestabilidad se desplaza a valores más próximos al estado trivial (ver de nuevo Figura 4.4) y se toleran mayores fluctuaciones alrededor del estado de coexistencia. Un efecto contrario sucede si se incrementan los valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$.

Como conclusión, del análisis estocástico se desprende que no sólo las constantes cinéticas de degradación sino el volumen del sistema son factores críticos para determinar la capacidad de automantenimiento del sistema en condiciones prebióticas. Idealmente, el volumen en el que se encuentre confinado el sistema debe ser intermedio: no demasiado pequeño, porque si no, por debajo de un cierto volumen crítico éste colapsa (tiene mucha mayor probabilidad de terminar en el estado trivial a tiempos relativamente cortos, o más bien a escalas de tiempo prebióticas); pero tampoco demasiado grande, ya que entonces requiere disponer inicialmente de concentraciones de intermediarios próximas a las del estado estacionario inestable determinista para alcanzar el estado de coexistencia, algo que con volúmenes pequeños puede conseguirse con cierta probabilidad con cebos mucho menores.

diferencia $ns-nu$ aumenta con el volumen (para concentraciones iguales, el volumen y el número de moléculas escalan de la misma manera), se predeciría que la probabilidad de extinción en un cierto tiempo disminuye exponencialmente con el tamaño del sistema: $\Omega = \omega^{(ns-nu)V}$. Sin embargo esto es obviamente una subestimación, entre otros aspectos porque los eventos que implica no serán equiprobables. Cada uno de ellos dependerá en última instancia de cómo es el potencial en la región del espacio fase en que se encuentran.

Caja 4.1 Implementación del método de Gillespie

El método de Gillespie es un procedimiento Monte-Carlo de simulación exacta de la ecuación maestra aplicable a procesos markovianos de nacimiento y muerte, como es el caso de reacciones químicas u otros procesos que presentan esquemas cinéticos semejantes. El algoritmo arranca con la definición de un estado inicial del sistema, es decir, con la asignación de poblaciones iniciales a las distintas variables aleatorias o especies del modelo, y consiste en un proceso iterativo de cuatro fases: En primer lugar, se calculan las distintas probabilidades de transición por unidad de tiempo $\omega(i/j)$ de abandonar el estado i del sistema, bien por generación, transformación o desaparición de alguna molécula. Posteriormente, a través de una variable aleatoria $P(\tau)$ comprendida entre 0 y 1, obtenida con un generador de números aleatorios, se calcula el tiempo τ que transcurre hasta un nuevo evento:

$$\tau = \frac{1}{\sum_{j \neq i} \omega(i/j)} \ln \frac{1}{P(\tau)} \quad \text{Ec. 4.4}$$

El término $\sum_{j \neq i} \omega(i/j)$ designa de modo sencillo la suma de todas las probabilidades de transición por unidad de tiempo. Así, el tiempo de permanencia en el estado i depende de modo inverso de la probabilidad de que suceda algún evento en la unidad de tiempo. A continuación, se genera un segundo número aleatorio que determina qué proceso concreto va a suceder en el tiempo $t + \tau$, siendo más probables aquellos procesos cuyas probabilidades de transición por unidad de tiempo son mayores. Por último, una vez elegido el evento, se actualiza en consecuencia el estado del sistema y el tiempo transcurrido de simulación t . El proceso se repite para el nuevo estado del sistema, y así sucesivamente. De esta manera finalmente se obtiene un camino aleatorio de las poblaciones moleculares. En cualquier caso, para obtener información sobre la función distribución de probabilidad a ciertos tiempos, será necesario realizar múltiples simulaciones independientes a partir de la misma condición inicial.

En el caso del modelo en estudio, las transiciones posibles entre estados de las variables aleatorias vienen determinadas por las reacciones químicas definidas (Figura 3.1). Existen 19 transformaciones posibles: 16 correspondientes a las 8 reacciones reversibles y 3 correspondientes a las reacciones irreversibles. Cada una tiene asociada una probabilidad de transición por unidad de tiempo, que en el caso de los pasos monomoleculares se calcula como el producto de la constante cinética de reacción correspondiente (en unidades τ^{-1} ; Tabla 4.1) y el número de moléculas de la especie involucrada. Así, por ejemplo, si el sistema se encontrara inicialmente ($t = 0$) en un estado i con poblaciones m_i de todos los intermediarios M, la transición asociada a la reacción 4 del modelo sería $stu_i \rightarrow stu_{i-1}$ (manteniendo las poblaciones m_i del resto de metabolitos), y su probabilidad por unidad de tiempo resultaría:

$$\omega(stu_i / stu_{i-1}) = k_4 stu_i \quad \text{Ec. 4.5}$$

En el caso de los pasos bimoleculares, las probabilidades de transición por unidad de tiempo se calculan de modo semejante como el producto de una constante cinética y los tamaños poblacionales de las especies que interactúan. No obstante, como las constantes cinéticas de segundo orden toman dimensión de concentración⁻¹ tiempo⁻¹, éstas han de ser primeramente transformadas a constantes de dimensión tiempo⁻¹. Para ello todas las constantes cinéticas que en la Tabla 4.1 aparecen con unidades $\text{mM}^{-1} \tau^{-1}$ se han dividido por $N_A V 10^{-3}$, donde N_A es el número de Avogadro (mol^{-1}), V el volumen del sistema (L), y 10^{-3} el factor de conversión (mol/mmol). De este modo, en una situación equivalente de poblaciones m_i de todos los metabolitos, para la reacción 5 se obtiene:

$$\omega(st_i, su_i, sust_i / st_{i-1}, su_{i-1}, sust_{i+1}) = \frac{k_5}{N_A V 10^{-3}} st_i su_i \quad \text{Ec. 4.6}$$

De igual forma se procede para calcular la probabilidad de transición por unidad de tiempo asociada a cada una de las transformaciones bimoleculares posibles restantes.

Caja 4.2: Cálculo de tiempos de evolución

Los tiempos de recuperación y extinción han sido estimados aproximando la metodología determinista de cálculo de tiempos característicos T_c desarrollada por (Lloréns et al., 1999) al análisis de curvas estocásticas. El tiempo característico se define como el tiempo medio de transición, y se ha calculado para las poblaciones de los diversos intermediarios M_i desde el valor de estado estacionario determinista inestable, bien hasta el estado de coexistencia de poblaciones no nulas de intermediarios, denominado estado de coexistencia, o hasta el estado estacionario trivial. Concretamente, en el estudio determinista estas transiciones se producen a través de curvas monótonamente crecientes y decrecientes, respectivamente, por lo que el tiempo característico de cada metabolito T_c^i puede ser calculado de la siguiente manera:

$$T_c^i = \frac{\int_0^\infty t \frac{df_i}{dt} dt}{\int_0^\infty \frac{df_i}{dt} dt} = \frac{\int_0^\infty [f_{i,t \rightarrow \infty} - f_i(t)] dt}{f_{i,t \rightarrow \infty} - f_{i,t=0}} \quad \text{Ec. 4.7}$$

donde $f_i(t)$ es la función de evolución temporal de la concentración del intermediario M_i . Como muestra el primer miembro, el tiempo característico no es otra cosa que el valor medio de la distribución de la derivada de dicha función en cada tiempo df_i/dt . Y como se sigue del último miembro de la ecuación, este tiempo característico se obtiene fácilmente como el área encerrada entre el valor final de la función y su valor a cada tiempo, normalizada por la altura total recorrida (Figura 4.8A). Este tipo de cálculo se ha extrapolado a la evolución de las soluciones de las simulaciones estocásticas, con las siguientes consideraciones (Figura 4.8B-C):

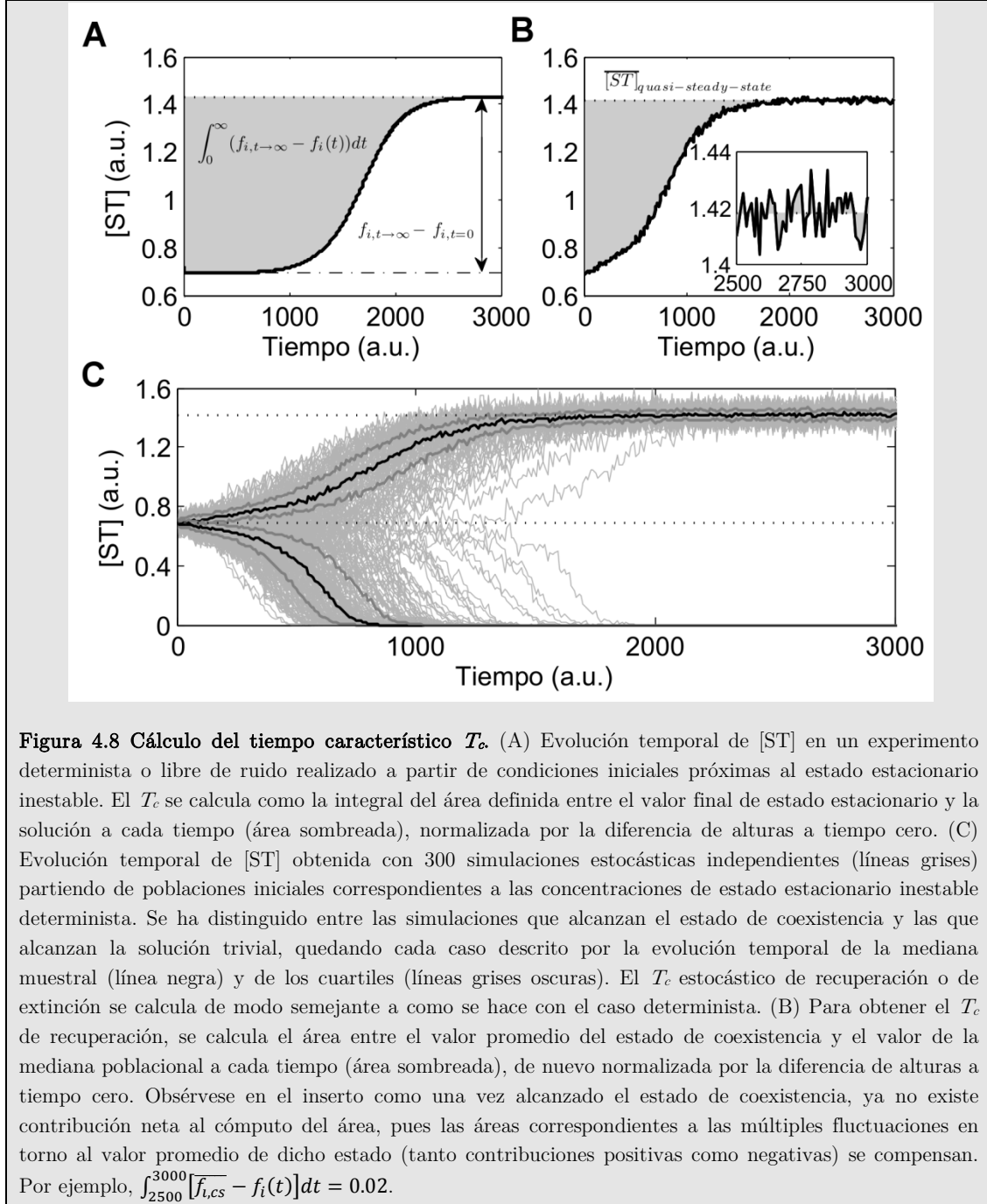
1. Se ha considerado que el comportamiento muestral puede ser descrito a través de las curvas de evolución temporal de la mediana muestral y de los cuartiles 1 y 3 a cada tiempo (Figura 4.8B). Éstas presentan bastante menos ruido que las curvas correspondientes a las simulaciones individuales. Se han descartado la media y la desviación típica como estadísticos descriptivos temporales, ya que las distribuciones poblacionales a tiempos intermedios (por ejemplo en torno a 1500τ en la Figura 4.8B) resultan muy asimétricas.

2. Las curvas de evolución temporal de la mediana y los cuartiles no son monótonas. Sin embargo, para las simulaciones dirigidas al estado de coexistencia se cumple que a tiempos suficientemente largos los valores de la mediana muestral (Figura 4.8C) se mantienen fluctuantes en torno a aquellos que debieran corresponder a la media muestral en el estado de coexistencia ($\overline{f_{i,cs}}$). La media de este estado, en el que la distribución se presenta simétrica, se obtiene como la recta de regresión lineal paralela al eje temporal de los puntos de la simulación que aparecen a partir de un tiempo suficientemente largo, y se considera como estado final de referencia en estos casos.

3. Aunque las curvas obtenidas terminen fluctuando alrededor del estado final de referencia $\overline{f_{i,cs}}$, se ha comprobado que las contribuciones de las áreas calculadas por encima y por debajo de éste se compensan (Figura 4.8C, inserto), por lo que puede aplicarse la ecuación determinista (Ecuación 4.7).

4. Como el sistema siempre alcanzará la barrera absorbente para $t \rightarrow \infty$, la ecuación utilizada para calcular el T_c de llegada al estado de coexistencia (T_c de recuperación) debe cambiar el límite superior de integración de la Ecuación 4.7 por un tiempo finito (t_{end}) para el cual las condiciones 2 y 3 se cumplan:

$$T_c^i = \frac{\int_0^{t_{\text{end}}} [\overline{f_{i,cs}} - f_i(t)] dt}{\overline{f_{i,cs}} - f_{i,t=0}} \quad \text{Ec. 4.8}$$



Capítulo 5

5 El sistema en un escenario de síntesis basal no catalizada de intermediarios

En el modelo desarrollado hasta ahora todos los procesos de síntesis de los productos se han considerado reacciones catalizadas. En ausencia de catalizadores se supone que no hay posibilidad alguna de síntesis. Sin embargo, es razonable que además de las reacciones catalizadas, sucedan a su vez, aunque más lentamente, las correspondientes transformaciones no catalizadas. La presencia de un catalizador no altera la diferencia de energía libre de Gibbs de una reacción, y por tanto su constante de equilibrio K_{eq} . Una reacción que es exergónica sucederá espontáneamente tanto en presencia de un catalizador como sin él. Aunque por supuesto, la velocidad de operación podrá ser muy distinta en un caso y en el otro. Con el advenimiento de metabolismos más sofisticados, con una gran eficacia de catálisis, los procesos no catalizados apenas contribuirán a la dinámica y podrán despreciarse. No obstante, éstos todavía podrían haber jugado un papel relevante en el comportamiento de sistemas más primitivos basados en catalizadores más rudimentarios. Este es el caso del modelo en estudio, postulado en un escenario prebiótico. Por ello es conveniente considerar en el modelo las reacciones no catalizadas de síntesis de los productos. Su inclusión permite mejorar la coherencia termodinámica del modelo y por tanto explorar de manera más realista el comportamiento del sistema.

Debe señalarse que la inclusión de este tipo de procesos no catalizados no compromete la capacidad de cierre catalítico. En virtud de la red de reacciones catalizadas, el sistema seguirá presentando cierre a causas eficientes: todos los catalizadores siguen siendo a su vez producto de las reacciones en que intervienen. Ahora bien, el nuevo mecanismo de síntesis no catalizada añade el matiz de que los catalizadores no son exclusivamente producidos por ellas, sino que pueden ser generados espontáneamente a partir de los precursores. Este aspecto está contemplado como requisito en algunas teorías sobre el origen de la organización biológica (por ejemplo, en los conjuntos RAF (Hordijk y Steel, 2004)), y puede ser esencial para comprender mejor la emergencia y capacidad de automantenimiento del sistema. Hasta el momento, el sistema planteaba un dilema de tipo “huevo-gallina”: su funcionamiento estaba condicionado por la presencia de catalizadores. Pero al mismo tiempo la producción de catalizadores requería de reacciones catalizadas. Así, el sistema era incapaz de construirse en ausencia total de intermediarios o catalizadores (es decir, desde el estado trivial), aun manteniéndose las concentraciones no nulas constantes de los precursores S, T y U. Se requería inicialmente al menos

una mínima cantidad de algún intermediario como cebo para poder motivar la construcción *de novo* del sistema. En este sentido, ¿puede la acción basal de las reacciones de síntesis no catalizada promover el arranque del mecanismo catalítico de síntesis? Es fundamental plantear un estudio en profundidad para analizar de qué manera contribuyen estas reacciones en el comportamiento global del sistema.

5.1 Modelo cinético

El modelo a analizar en este capítulo contempla el mismo esquema de reacciones considerado en los capítulos precedentes (Figura 3.1), con la particularidad de que incluye además tres nuevas reacciones no catalizadas de síntesis espontánea de los productos ST, SU y STU a partir de los precursores S, T y U, es decir:



La elección de estas tres reacciones no catalizadas no ha sido arbitraria, sino que responde al hecho de que cada una de ellas corresponde con la reacción neta en cada uno de los tres ciclos catalíticos del sistema. Con ello, el nuevo esquema completo de reacciones queda definido como se detalla en la Figura 5.1, donde se distinguen las reacciones accesorias de síntesis no catalizada (en gris) de las correspondientes a los ciclos de catálisis que conforman el “núcleo” protometabólico (en negro).

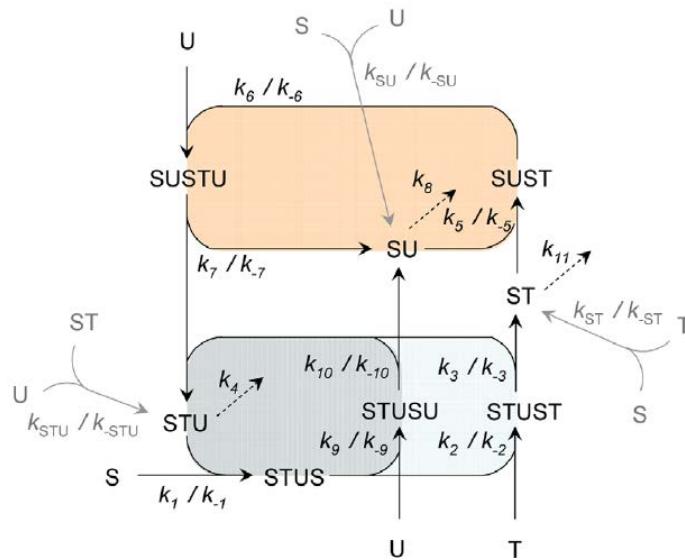


Figura 5.1 Modelo cinético de un sistema de reacciones sugerido como posible protometabolismo. Tres ciclos catalíticos interrelacionados (en distintos colores) definen el protometabolismo central, una red de reacciones que presenta cierre a causas eficientes y es capaz de transformar los precursores en los catalizadores STU, ST y SU (reacciones marcadas como flechas negras). Existen además tres reacciones accesorias de síntesis no catalizada de los catalizadores (en gris). Estos a su vez se degradan irreversiblemente en las reacciones 4, 8 y 11 (flechas discontinuas). Todas las reacciones salvo las de degradación son reversibles, con una constante cinética directa k_i definida en el sentido marcado por las flechas y otra reversa k_{-i} referida al sentido opuesto.

De nuevo, todas las reacciones, salvo aquellas de degradación de los catalizadores, se consideran reversibles; lógicamente, también las no catalizadas, para mantener la coherencia con la reversibilidad de los ciclos catalíticos correspondientes. Asimismo, los parámetros toman los valores señalados en la Tabla 5.1. Al igual que antes, las unidades serán arbitrarias en el análisis determinista, mientras que en el análisis estocástico se asignarán unidades mM a las concentraciones (τ al tiempo).

Tabla 5.1 Valores de las constantes cinéticas y concentraciones fijas del modelo.

Constantes cinéticas	
Reacciones de 1^{er} orden (τ^{-1})	Reacciones de 2^a orden ($\text{mM}^{-1} \tau^{-1}$)
$k_1 = 10$	$k_1 = 100$
$k_2 = 10$	$k_2 = 100$
$k_3 = 2$	$k_3 = 10$
$0 < k_4 < 0.6$	
$k_5 = 1$	$k_5 = 10$
$k_6 = 1$	$k_6 = 10$
$k_7 = 0.1$	$k_7 = 1$
$0 < k_8 < 0.6$	
$k_9 = 0.05$	$k_9 = 1$
$k_{10} = 0.05$	$k_{10} = 0.5$
$0 < k_{11} < 0.6$	
$k_{ST} = 0.001^*$	$k_{ST} = 0.02^*$
$k_{STU} = 0.001^*$	$k_{STU} = 0.01^*$
$k_{SU} = 0.001^*$	$k_{SU} = 0.02^*$
Concentraciones externas (mM)	
$[S_{\text{out}}] = 0.4$	
$[T_{\text{out}}] = 0.2$	
$[U_{\text{out}}] = 0.1$	

* Todos los parámetros presentan los valores ya definidos en capítulos previos (Tabla 4.1), excepto aquellos marcados con un asterisco, que son nuevos.

Es importante destacar (en la Tabla 5.1) que a las constantes cinéticas de las nuevas reacciones de condensación no catalizadas se les han asignado valores significativamente menores que los que toman las de los procesos catalizados, con objeto de remarcar el efecto cinético de los catalizadores. Concretamente se les han asignado valores unos cuatro órdenes de magnitud menores, siendo conscientes de que la efectividad en la acción de los catalizadores primitivos distaría mucho de ser como la de las proteínas actuales³². En cualquier caso, esta labor se ha hecho

³² La extraordinaria capacidad catalítica de las enzimas se debe principalmente a su compleja conformación. Un ejemplo claro se obtiene con el caso de la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Como señala el propio Oparin (1924), esta reacción se acelera levemente en presencia de hierro inorgánico, y sucede unas mil veces más rápida si el hierro está combinado con una sustancia orgánica como es el pirrol. Sin embargo la velocidad es del orden de diez mil veces mayor en presencia de cantidades equivalentes de catalasa, a pesar de que ésta alberga también hierro y pirrol (en forma hemo) como grupo prostético en su centro activo. No se pretende argumentar que el complejo hierro-pirrol sea una molécula de relevancia prebiótica, sino simplemente señalar que los catalizadores prebióticos tendrían mucha menor complejidad conformacional que un enzima, y por tanto su capacidad catalítica estaría más próxima a la que se observa con estos pequeños compuestos orgánicos solos. Por eso en el modelo en estudio se han considerado

de tal manera que no se viole la termodinámica de los procesos globales, es decir, la constante de equilibrio de cada uno de los procesos no catalizados coincide con la constante de equilibrio global del correspondiente ciclo catalítico que forma el mismo producto. De esta manera, por ejemplo $K_{ST}^{eq} = K_1^{eq} = K_2^{eq} = K_3^{eq}$, como se desarrolla a continuación³³:

$$K_{ST}^{eq} = \frac{[ST]^{eq}}{[S]^{eq}[T]^{eq}} = \frac{k_{ST}}{k_{-ST}} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}} = 2 \times 10^4 \quad \text{Ec. 5.2}$$

La variación de energía libre estándar aparente de formación de cada catalizador puede calcularse fácilmente a partir del valor de la correspondiente constante K^{eq} , de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta G^{\circ'} = -RT(\ln K^{eq}) \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde R es la constante de los gases ($8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T la temperatura absoluta (298 K en condiciones estándar). Resulta ser aproximadamente -25 kJ/mol para la condensación de ST, pero valores negativos semejantes se obtienen para la producción de los otros dos productos, lo cual es consistente con el hecho de que estos procesos de síntesis se consideren termodinámicamente favorables. Esto puede *a priori* contrastar con la observación general de que los procesos de condensación son típicamente endergónicos. No obstante se presupone que el uso de precursores ricos en energía (S, T y U) es la fuerza responsable de que el sistema opere en todo momento preferencialmente hacia la formación espontánea de los catalizadores³⁴.

5.2 Soluciones estacionarias y dependencia de velocidades de degradación

Al igual que se hiciera con el modelo más sencillo anterior, la evolución temporal de las concentraciones de los distintos metabolitos intermediarios puede describirse mediante un sistema

razonablemente eficiencias de catálisis parecidas a la del hierro-pirrol, es decir velocidades cuatro órdenes de magnitud mayores que las de las mismas reacciones sin catalizar. Se volverá a tratar el asunto de la eficiencia de catálisis prebiótica en la Discusión.

³³ Aunque la constante de equilibrio termodinámica K^{eq} es una variable adimensional, en bioquímica es habitual trabajar en términos de la constante de equilibrio aparente de asociación o disociación K'^{eq} , que omite en su ecuación la contribución de la concentración del agua como reaccionante o producto (que es prácticamente constante) y toma unidades M o M^{-1} según se trate de una reacción de hidrólisis o condensación (Nelson y Cox, 2004). Se puede suponer que en este modelo queda implícito el consumo y liberación de agua en las reacciones unimoleculares y bimoleculares, respectivamente, por lo que la constante de equilibrio del proceso de formación de ST (condensación) se considera como una K'^{eq} , con unidades M^{-1} . Del mismo modo, por convención, se emplea como referencia la correspondiente variación de energía libre de Gibbs estándar aparente.

³⁴ La mayoría de los procesos anabólicos del metabolismo están acoplados con reacciones fuertemente exergónicas de hidrólisis de compuestos ricos en energía, tales como la hidrólisis del ATP ($\Delta G^{\circ'} = -30.5 \text{ kJ/mol}$), capaces de permitir reacciones que de otra manera serían desfavorables. De alguna manera, se considera implícitamente que los precursores de este sistema liberarían también cierta energía en los sucesivos pasos de incorporación, dando lugar finalmente a las especies inactivas que resultaran de la degradación irreversible de los catalizadores. De hecho, es en última instancia el flujo continuo de materia y energía considerado desde S, T y U hasta los productos inactivos de degradación lo que hace al sistema termodinámicamente abierto, permitiendo su funcionamiento en condiciones alejadas del equilibrio. En la Discusión se tratará más sobre la posible naturaleza de los precursores ricos en energía en condiciones prebióticas.

de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs). De acuerdo con la notación de la Figura 5.1, resulta:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{STU}]}{dt} &= k_{-1}[\text{STUS}] + k_3[\text{STUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] + k_{\text{STU}}[\text{ST}][\text{U}] - k_1[\text{S}][\text{STU}]... \\
 &\quad ... - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_4[\text{STU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-\text{STU}}[\text{STU}] \\
 \frac{d[\text{STUS}]}{dt} &= k_1[\text{S}][\text{STU}] + k_{-2}[\text{STUST}] + k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{-1}[\text{STUS}] - k_2[\text{T}][\text{STUS}] - k_9[\text{U}][\text{STUS}] \\
 \frac{d[\text{STUST}]}{dt} &= k_2[\text{T}][\text{STUS}] + k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_{-2}[\text{STUST}] - k_3[\text{STUST}] \\
 \frac{d[\text{ST}]}{dt} &= k_3[\text{STUST}] + k_{-5}[\text{SUST}] + k_{\text{ST}}[\text{S}][\text{T}] + k_{-\text{STU}}[\text{STU}]... \\
 &\quad ... - k_{-3}[\text{STU}][\text{ST}] - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{11}[\text{ST}] - k_{-\text{ST}}[\text{ST}] - k_{\text{STU}}[\text{ST}][\text{U}] \\
 \frac{d[\text{SU}]}{dt} &= k_{-5}[\text{SUST}] + k_7[\text{SUSTU}] + k_{10}[\text{STUSU}] + k_{\text{SU}}[\text{S}][\text{U}]... \\
 &\quad ... - k_5[\text{ST}][\text{SU}] - k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_8[\text{SU}] - k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-\text{SU}}[\text{SU}] \\
 \frac{d[\text{SUST}]}{dt} &= k_5[\text{ST}][\text{SU}] + k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_{-5}[\text{SUST}] - k_6[\text{U}][\text{SUST}] \\
 \frac{d[\text{SUSTU}]}{dt} &= k_6[\text{U}][\text{SUST}] + k_{-7}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-6}[\text{SUSTU}] - k_7[\text{SUSTU}] \\
 \frac{d[\text{STUSU}]}{dt} &= k_9[\text{U}][\text{STUS}] + k_{-10}[\text{STU}][\text{SU}] - k_{-9}[\text{STUSU}] - k_{10}[\text{STUSU}]
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 5.4}$$

De nuevo, los distintos estados estacionarios posibles que presente el sistema se podrán obtener por resolución del sistema algebraico de ecuaciones que se derive de igualar a cero todas las ecuaciones diferenciales previas. Sin embargo, al resultar un sistema de ecuaciones algebraicas no lineales algo complicado, no se ha procedido a resolverlo simbólicamente. Basta señalar que ahora aparecen términos independientes en dichas ecuaciones³⁵, que harán que el estado trivial de concentraciones nulas de metabolitos deje de ser una solución estacionaria posible. Así pues, las soluciones de estado estacionario han sido halladas por resolución numérica del sistema de ecuaciones algebraicas, considerando los valores de los parámetros presentados en la Tabla 5.1. Concretamente se ha seguido el método iterativo de Newton-Raphson de cálculo de raíces de funciones (ver Material y Métodos). Adicionalmente, experimentos de integración numérica de las ecuaciones diferenciales (Ecuación 3.3) han permitido confirmar los valores de concentración de los estados estacionarios estables obtenidos.

El número y tipo de estados estacionarios posibles se ha explorado para un amplio rango de valores de las constantes cinéticas de degradación, $k_4 = k_8 = k_{11}$. La Figura 5.2 ilustra los resultados en términos de la concentración de ST, pero efectos cualitativamente similares se obtienen para el resto de concentraciones de intermediarios. El comportamiento del sistema sigue siendo sensible a las velocidades de degradación, aunque la inclusión de las reacciones no catalizadas de síntesis de catalizadores supone ciertas diferencias sustanciales respecto al diagrama

³⁵ Se considera en todo momento que [S], [T] y [U] no son variables del sistema sino parámetros fijos (con valores no nulos constantes). Por tanto, dadas estas restricciones, algunos de los nuevos términos de las ecuaciones algebraicas se comportarán como independientes de las variables. Por ejemplo, este será el caso de términos como $k_{\text{SU}}[\text{S}][\text{U}]$, $k_{\text{ST}}[\text{S}][\text{T}]$, etc.

de bifurcación obtenido con el modelo descrito en los capítulos anteriores (Figura 3.7), como se expone a continuación.

Para valores relativamente altos de las constantes cinéticas de degradación ($k_4 = k_8 = k_{11} > 0.373 \tau^{-1}$) el sistema sigue siendo incapaz de mantenerse en un estado con concentraciones significativas de intermediarios. En esta región del espacio de parámetros sólo un estado estacionario es posible. No obstante, en lugar de tratarse de un estado estacionario trivial de concentraciones nulas, corresponde con un **estado residual** (Figura 5.2, en rojo) en el cual el sistema muestra concentraciones de intermediarios próximas a cero pero no nulas, gracias fundamentalmente a la actividad basal de los procesos no catalizados de síntesis.

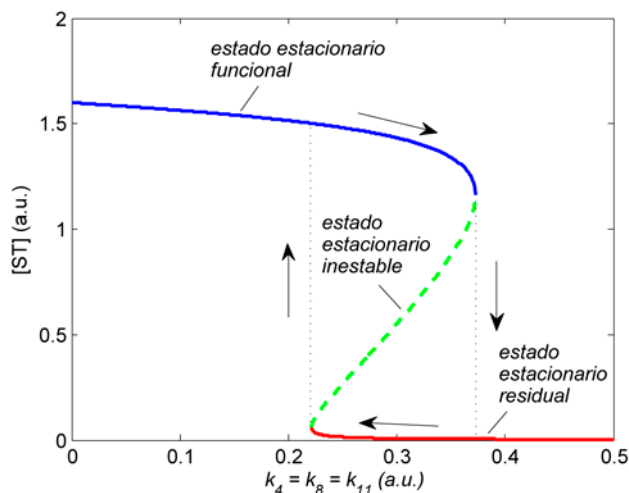


Figura 5.2 Diagrama de bifurcación. Comportamiento de las soluciones estacionarias obtenido en función de los valores de las constantes cinéticas de degradación, k_4 , k_8 y k_{11} . Dos puntos de bifurcación aparecen: uno ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.221 \tau^{-1}$) separando un régimen de monoestabilidad del estado estacionario funcional (en azul) de una región de biestabilidad en la que este estado coexiste con un estado residual (en rojo) y en la que aparece un estado estacionario inestable separándolos (en verde); y otro ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0.373 \tau^{-1}$) separando ésta segunda región de un régimen de monoestabilidad del estado estacionario residual. Las flechas indican el comportamiento de histéresis del sistema.

Cuando los valores de las constantes cinéticas de degradación son menores ($0.221 \tau^{-1} < k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$), el estado residual previamente descrito coexiste con un estado estacionario de concentraciones relativamente altas de intermediarios (Figura 5.2, en azul), denominado **estado estacionario funcional**. Éste es equivalente al estado estacionario no trivial estable obtenido con el modelo anterior³⁶, es decir, un régimen automantenido en el que el sistema permanece produciendo permanentemente sus propios componentes a pesar de su continua degradación. En este sentido el comportamiento es parecido al del modelo previo, ya que como se describiera anteriormente, aparece biestabilidad: ambos estados estacionarios (en este caso residual y funcional) son asintóticamente estables y se encuentran separados entre sí por un estado estacionario inestable (un punto silla; Figura 5.2, en verde). Sin embargo, si las constantes cinéticas de degradación toman valores suficientemente pequeños ($k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$),

³⁶ La nueva terminología ha sido introducida para evitar confusión y distinguir entre las dos soluciones, ya que ahora ambas corresponden con estados estacionarios no nulos estables. La diferencia tan notoria que existe tanto en las concentraciones como en los flujos de estado estacionario entre uno y otro caso permite en la práctica reconocer un estado como *funcional* (operativo) y el otro como *residual* (muy lejano del óptimo en términos de capacidad de transformación química).

ahora desaparece el régimen de biestabilidad y el único estado estacionario presente es el estado funcional, que mantiene concentraciones relativamente altas de todos los intermediarios.

Conviene indicar que estas diferencias observadas con respecto al diagrama de bifurcación del modelo anterior no afectan cualitativamente a la capacidad de automantenimiento del sistema. La conclusión en todo caso es semejante: existe un estado estacionario estable funcional de concentraciones no nulas significativas relativamente robusto en el espacio de parámetros, presente en un amplio rango de valores de las constantes cinéticas de degradación (en $0 \leq k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$ para el caso en estudio, pero prácticamente igual en el modelo previo: $0 \leq k_4 = k_8 = k_{11} < 0.367 \tau^{-1}$). Dicho de otra manera, *el automantenimiento sigue recayendo en las reacciones catalizadas*. No obstante, las peculiaridades que surgen en el comportamiento de las soluciones al incluir las reacciones no catalizadas de síntesis sí tienen importantes repercusiones en el comportamiento dinámico, y concretamente en la capacidad de autoconstrucción o nucleación del sistema, tal como se detalla a continuación.

5.2.1 Histéresis y capacidad de autoconstrucción

La existencia de dos puntos de bifurcación (en $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.221 \tau^{-1}$ y $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.373 \tau^{-1}$) motiva la aparición de un interesante *ciclo de histéresis*³⁷. Suponiendo que el sistema se encuentre en el estado residual, a medida que los valores de las constantes de degradación disminuyan³⁸ (desplazándose hacia la izquierda en la Figura 5.2), el sistema seguirá permaneciendo en el mismo estado siempre y cuando los valores de las constantes cinéticas de degradación se mantengan por encima del punto crítico $0.221 \tau^{-1}$. Por debajo de este punto el sistema experimenta un salto brusco en las concentraciones de intermediarios, que alcanzan aquellos valores propios del estado estacionario estable funcional. Una vez en este estado estacionario funcional, el sistema permanecerá en él incluso en el caso de que los valores de las constantes de degradación aumenten por encima del punto crítico $0.221 \tau^{-1}$ (desplazándose hacia la derecha en la Figura 5.2). Es necesario que estos valores superen el punto crítico $0.373 \tau^{-1}$ para observar el colapso al estado residual. En esta transición repentina todas las concentraciones se hacen rápidamente muy pequeñas, presumiblemente como consecuencia de la incapacidad de los ciclos catalíticos autoproducidos de compensar la rápida degradación que afecta a sus componentes.

Este comportamiento de histéresis no es ya sólo interesante porque confirma que el estado estacionario funcional es relativamente robusto frente a los valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$, sino principalmente porque explica cómo el sistema podría *emerger* espontáneamente a partir de tan sólo sus precursores, dado un cierto escenario de valores relativamente bajos de las constantes cinéticas de degradación. En efecto, tal como muestra la evolución temporal de las concentraciones en la Figura 5.3, cuando $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$, la formación del sistema operativo (funcional) es un suceso seguro aun en ausencia absoluta de catalizadores o intermediarios disponibles inicialmente. El proceso lento de formación espontánea no catalizada de intermediarios a partir de los precursores es suficiente para motivar la producción de una cierta cantidad de catalizadores, que a su vez desencadena la construcción del sistema. Esta capacidad de autoconstrucción contrasta claramente con la necesidad imperiosa que tenía el sistema de disponer de al menos

³⁷ La histéresis es un fenómeno físico por el cual algunos sistemas son capaces de preservar una cierta propiedad una vez que desaparece el estímulo necesario para originarla (es decir, tras cambiar las variables de estado). Así, su comportamiento no depende ya sólo de su estado actual sino de su historia anterior. En este sentido se dice que el comportamiento conserva una cierta “memoria”.

³⁸ Esto podría suceder por ejemplo como consecuencia de cambios en la temperatura ambiente (ver Discusión).

ciertas concentraciones iniciales de cebamiento para superar la barrera separatriz y poderse construir en ausencia de procesos no catalizados de síntesis. Representa por ello la novedad más importante respecto al comportamiento dinámico determinista del modelo presentado en el Capítulo 3.

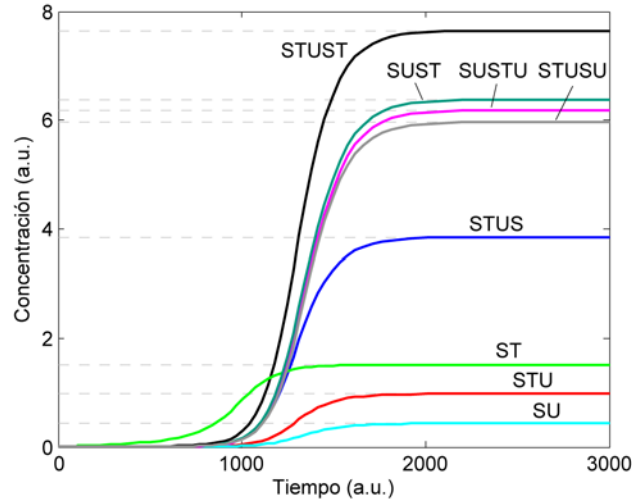


Figura 5.3 Emergencia espontánea del sistema por autoconstrucción a partir de sus precursores. Se muestra la evolución temporal de los distintos intermediarios en un experimento de integración numérica realizado para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.2$ partiendo de concentraciones iniciales de todos los intermediarios iguales a cero. Todos ellos alcanzan los valores de concentración hallados numéricamente para el estado estacionario funcional (líneas discontinuas).

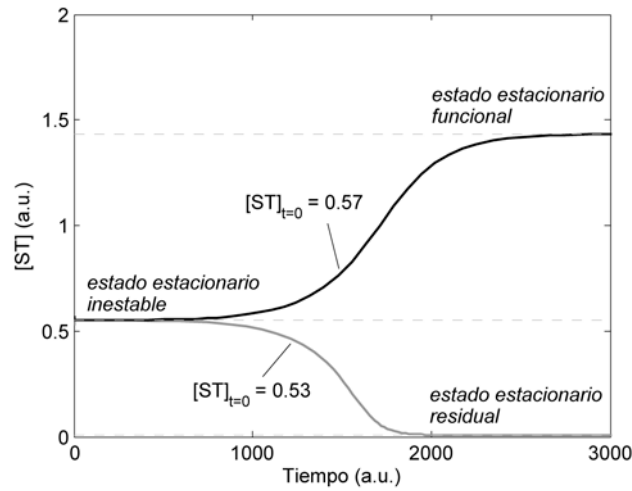


Figura 5.4 Evolución temporal de la concentración de ST partiendo de condiciones iniciales próximas al estado estacionario inestable. Dos experimentos de integración numérica se han realizado para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3$: (a) $[ST]_{t=0} = 0.530$. (b) $[ST]_{t=0} = 0.570$. En ambos casos el resto de concentraciones iniciales se mantienen iguales a las del estado estacionario inestable: $[STU]_{t=0} = 0.027$, $[STUS]_{t=0} = 0.088$, $[STUST]_{t=0} = 0.159$, $[SU]_{t=0} = 0.017$, $[SUST]_{t=0} = 0.086$, $[SUSTU]_{t=0} = 0.079$, $[STUSU]_{t=0} = 0.091$. La evolución del sistema hacia uno u otro estado estacionario estable está determinada por la condición inicial: concentraciones iniciales de intermediarios por encima de la barrera separatriz conducen al estado funcional o de automantenimiento, mientras que concentraciones por debajo de ésta conducen al estado residual.

Evidentemente, la emergencia *de novo* sólo es posible por debajo del punto de bifurcación o valor crítico $0.221 \tau^{-1}$. En el rango de valores de las constantes cinéticas de degradación en que se obtiene el régimen biestable, el estado estacionario inestable se encuentra asociado a una

barrera separatriz que delimita las áreas de atracción de los dos estados estacionarios estables, y la construcción del sistema requiere de nuevas concentraciones iniciales suficientemente favorables para superar esa barrera (Figura 5.4).

5.3 Análisis dinámico estocástico

Una vez analizado el sistema de manera determinista, ¿qué sucede al considerar ruido interno? ¿Cuál es ahora el efecto de las fluctuaciones en las concentraciones, producidas como consecuencia del confinamiento en volúmenes pequeños? ¿Qué diferencias se observan con respecto al comportamiento del sistema tratado en el capítulo anterior? De nuevo se ha planteado un análisis estocástico mediante simulaciones, siguiendo el método de Gillespie-Monte Carlo. No obstante, antes de ello podemos anticipar algunas peculiaridades en el comportamiento, que se deducen a partir de razonamientos sencillos previos a las simulaciones.

Nuevamente, el sistema puede desplazarse libremente por el espacio fase de posibles tamaños poblacionales de los intermediarios, y sólo existirá una única solución estacionaria, siendo como es la ecuación maestra lineal respecto a las probabilidades de estar en cada estado a un determinado tiempo (recordar la Ecuación 4.1). Pero a diferencia del modelo anterior, dejará de existir una barrera absorbente para poblaciones moleculares iguales a cero³⁹. Tal como se ha demostrado con el análisis determinista, el sistema puede ahora escapar del estado trivial de concentraciones nulas de intermediarios gracias a las reacciones no catalizadas de síntesis, que sólo requieren de los precursores S, T y U (éstos, salvo cuando se indique lo contrario, se seguirán considerando de concentración constante). Así, las probabilidades de transición por unidad de tiempo de ir del estado trivial de poblaciones nulas n_0 a otro estado n_j dejarán de ser cero, es decir $\omega(n_0/n_j) \neq 0$. Todo esto conlleva que la solución estacionaria estocástica, en vez de presentarse localizada en el estado trivial, será una distribución de probabilidad extendida a lo largo de múltiples valores de tamaños poblacionales. La pregunta ahora es qué características presenta esta distribución estacionaria, y si es compatible con el automantenimiento del sistema en un régimen de concentraciones alejado de la extinción.

5.3.1 Modos de la distribución estacionaria estocástica y posibles distribuciones transitorias cuasiestacionarias

En primer lugar se ha realizado un extenso estudio de simulación con objeto de explorar la dinámica estocástica en el espacio de parámetros y esclarecer qué posibles estados finales admite el sistema. Para ello, se han realizado, para diversos valores de las constantes cinéticas de degradación (k_4 , k_8 , k_{11}) y diversas condiciones iniciales de partida, múltiples simulaciones independientes, analizándose la evolución temporal de las poblaciones de los distintos metabolitos del sistema, al igual que se hiciera con el modelo anterior. Se han tomado las mismas consideraciones que antes para la conversión de las concentraciones iniciales de interés de los intermediarios en poblaciones moleculares. Los estados alcanzados por las poblaciones moleculares tras un tiempo relativamente largo (3000τ) darán una idea de cómo es la distribución estacionaria; en ciertos casos incluso, informarán de posibles distribuciones cuasiestacionarias⁴⁰,

³⁹ Ahora el estado trivial será tan sólo una barrera reflectante: obviamente, las poblaciones moleculares no pueden tomar valores negativos.

⁴⁰ Al igual que con el modelo previo, el sistema podrá adoptar transitoriamente, bajo ciertas condiciones, distribuciones cuasiestacionarias antes de alcanzar definitivamente la distribución estacionaria. Las

pudiéndose de todas maneras evaluar la correspondencia de los modos con los valores de los estados estacionarios estables hallados con la metodología determinista.

En principio, de acuerdo con el diagrama de bifurcación de la Figura 5.2, el aspecto de la distribución estacionaria estocástica estará condicionado por el valor de las constantes cinéticas de degradación, k_4 , k_8 , k_{11} . Es de esperar que sea unimodal en los espacios de parámetros para los que se obtiene un solo estado estacionario estable determinista (monoestabilidad), y bimodal en el caso de la región para la que se obtiene biestabilidad, quedando cada modo centrado sobre los valores de concentración de cada estado estacionario determinista. Por eso, por motivos prácticos el análisis se ha subdividido en tres partes, manteniendo en todo caso los valores de concentración de los estados estacionarios deterministas como referencia para establecer las diversas condiciones de partida de las simulaciones.

Cuando $k_4 = k_8 = k_{11} > 0.373 \tau^{-1}$, independientemente de cuáles sean las condiciones iniciales, las poblaciones moleculares de los distintos intermediarios terminan fluctuando alrededor de los valores de concentración propios del estado estacionario determinista residual, en lo que se puede denominar un **estado residual estocástico**. Se obtiene por tanto una distribución estacionaria unimodal que comprende tamaños poblacionales próximos a cero, en consistencia con un régimen determinista de monoestabilidad del estado estacionario residual.

En el extremo opuesto en el que $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$, el sistema siempre se dirige en cambio hacia un **estado operativo o funcional**, en el que cada metabolito mantiene tamaños poblacionales relativamente altos que fluctúan en torno a su valor específico de concentración del estado estacionario funcional obtenido de forma determinista. Obviamente, en este caso la distribución estacionaria también será unimodal, pero al estar centrada sobre la solución determinista funcional, es compatible con el automantenimiento del sistema en un régimen alejado de la extinción, al menos para volúmenes del sistema relativamente grandes. Nótese la diferencia fundamental: aunque también con el modelo anterior era posible alcanzar en esta región del espacio de parámetros un estado operativo o de coexistencia, éste no correspondía con la solución estacionaria estocástica, y su estabilidad estaba limitada en el tiempo, supeditada a la continua posibilidad de caída a la barrera absorbente (la solución trivial).

Finalmente, dentro del rango de valores de los parámetros para los que se obtiene biestabilidad determinista ($0.221 \tau^{-1} < k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$), el sistema puede evolucionar a tiempos relativamente cortos bien hacia el estado operativo (con poblaciones de intermediarios fluctuantes alrededor de la solución determinista funcional), o bien hacia el régimen residual de poblaciones escasas (concentraciones próximas a las del estado determinista residual) (Figura 5.5). El comportamiento en la escala de tiempo considerada (3000τ) ahora sí es muy semejante al obtenido con el modelo previo (Apartados 4.3.2 y 4.3.3). Al igual que sucedía entonces, la frecuencia de simulaciones que alcanzan uno u otro estado depende de las condiciones iniciales, por lo que en realidad resultan distribuciones de tipo cuasiestacionario, como se detalla a continuación.

Cuando se parte de las condiciones de concentraciones del estado estacionario determinista inestable, aproximadamente la mitad de las simulaciones se dirigen al estado operativo y la otra mitad al estado residual estocástico, de manera que se alcanza una distribución cuasiestacionaria de carácter bimodal. En la Figura 5.5A, los valores de población de ST obtenidos

distribuciones cuasiestacionarias dependen de las condiciones iniciales, a diferencia de la distribución estacionaria. Por tanto, pueden identificarse fácilmente al realizar el experimento con distintas concentraciones de partida, ya que entonces se observa que las frecuencias de llegada a los distintos estados o modos característicos de la distribución cambian.

con las distintas muestras independientes a tiempo 3000τ dan cuenta del aspecto que toma la distribución cuasiestacionaria en tales circunstancias. Sin embargo, a medida que las condiciones iniciales empleadas se alejan de los valores de concentración del estado estacionario determinista inestable, cambian las frecuencias de llegada a uno u otro estado y se altera por tanto la forma de la distribución cuasiestacionaria, es decir, la contribución relativa de cada modo a la distribución. De nuevo puede incluso suceder que ésta adopte forma unimodal (centrada en la solución determinista residual si las condiciones iniciales son muy restrictivas, o por el contrario en la solución determinista funcional si son muy favorables).

La dificultad para alcanzar la solución estacionaria estocástica en esta región de los parámetros donde aparece biestabilidad determinista radica una vez más en la presencia de una zona intermedia del espacio fase, situada entre ambos estados, particularmente inestable a los valores de los tamaños poblacionales de intermediarios. Ésta mantiene separados ambos modos correspondientes al estado residual y al funcional, y si bien facilita una temprana evolución del sistema hacia uno u otro estado, dificulta la redistribución de las poblaciones moleculares entre ellos, algo que es fundamental para alcanzar la distribución estacionaria final. La probabilidad de que a tiempos relativamente cortos sucedan eventos de transición del sistema de un modo al otro es muy baja, incluso en presencia de moderadas fluctuaciones. Por ejemplo, en el experimento de la Figura 5.5, realizado para un volumen del sistema $V = 10^{-18} \text{ L}$, no se ha detectado un solo evento de este tipo ni siquiera tras un tiempo de simulación de 9000τ (unos 6000τ después de haberse alcanzado la distribución cuasiestacionaria). Por eso, en definitiva, siempre y cuando se mantengan condiciones de los parámetros alejadas de puntos críticos, la distribución cuasiestacionaria obtenida con cada condición inicial será metaestable y seguirá prevaleciendo durante un largo periodo de tiempo (aunque este sea limitado). Sólo cuando el tiempo se aproxime a infinito se alcanzará con certeza la distribución estacionaria, la única que es propiamente estable.

Para el problema que aquí nos ocupa, que es la capacidad del sistema de persistir en regímenes alejados de la extinción, basta con considerar los estados en las distribuciones metaestables. Puede afirmarse, dada la relevancia de las distribuciones cuasiestacionarias, que en esta región de los parámetros la consecución o no de un régimen automantenido de poblaciones moleculares elevadas dependerá de las condiciones iniciales: concentraciones iniciales de intermediarios relativamente altas son más favorables para alcanzar el estado funcional (conducen con menor frecuencia al estado estocástico residual próximo a la extinción). En cualquier caso, conviene señalar que si bien las condiciones iniciales repercutirán sobre las proporciones en uno y otro modo de la distribución cuasiestacionaria, no alterarán las características esenciales de los dos estados. El conjunto de valores poblacionales de cada metabolito en un mismo modo mantiene la misma distribución, con la misma dispersión y valor promedio, independientemente de la condición de partida utilizada⁴¹. Por todo ello, no es necesario especificar las condiciones iniciales y la distribución cuasiestacionaria correspondiente: ya sea con mayor o menor probabilidad, el sistema en todo caso optará entre dos estados únicos, uno de los cuales es un estado funcional de

⁴¹ Este atributo, ya descrito sobre el estado de coexistencia del modelo anterior, está relacionado con la cuasi-ergodicidad en ambos estados residual y funcional estocásticos. Mientras el sistema se mantenga alejado de valores críticos de los parámetros, todos los valores de tamaño poblacional situados en torno a los estados residual y funcional son explorados con probabilidad no nula tras un tiempo suficientemente largo. Como ya se explicó en el capítulo anterior, la misma distribución obtenida a partir de la población de ST a un determinado tiempo en distintas muestras localizadas alrededor del mismo estado, se reproduce al considerar en un intervalo de tiempo razonablemente largo los valores poblacionales de ST de una sola simulación que haya alcanzado dicho estado. Obviamente, este principio también es válido alrededor de la solución estacionaria estocástica en el caso de aquellas regiones de $k_4 = k_8 = k_{11}$ para las que se obtiene monoestabilidad determinista. Entonces el sistema es ergódico.

coexistencia de poblaciones relativamente altas de intermediarios que puede ser caracterizado sin ambigüedad.

Hasta este punto, el comportamiento en esta región de los parámetros es muy parecido al que ya se obtuvo anteriormente, pero ¿qué sucede respecto a la distribución estacionaria? En ausencia de una barrera absorbente, la propia solución estacionaria estocástica será ahora una distribución bimodal, con dos modos situados alrededor de los dos estados estacionarios deterministas. Ésta es una diferencia sustancial con respecto al modelo previo, para el cual la solución estacionaria estocástica correspondía siempre con el estado trivial (con la extinción). Los resultados de simulación conducen a distribuciones cuasiestacionarias y no permiten precisar detalles de la distribución estacionaria final. Sin embargo, de acuerdo con la unicidad de los estados residual y funcional estocásticos entre las distintas distribuciones cuasiestacionarias, es obvio que la solución estacionaria adoptará distribuciones de idénticas características en torno a los modos: heredará el valor promedio y dispersión hallados sobre cada estado. Obviamente, la diferencia estará en la contribución relativa de cada modo a la distribución global. Esta cuestión será importante en relación con el tiempo de permanencia en el estado funcional a volúmenes pequeños del sistema, como se discutirá más adelante.

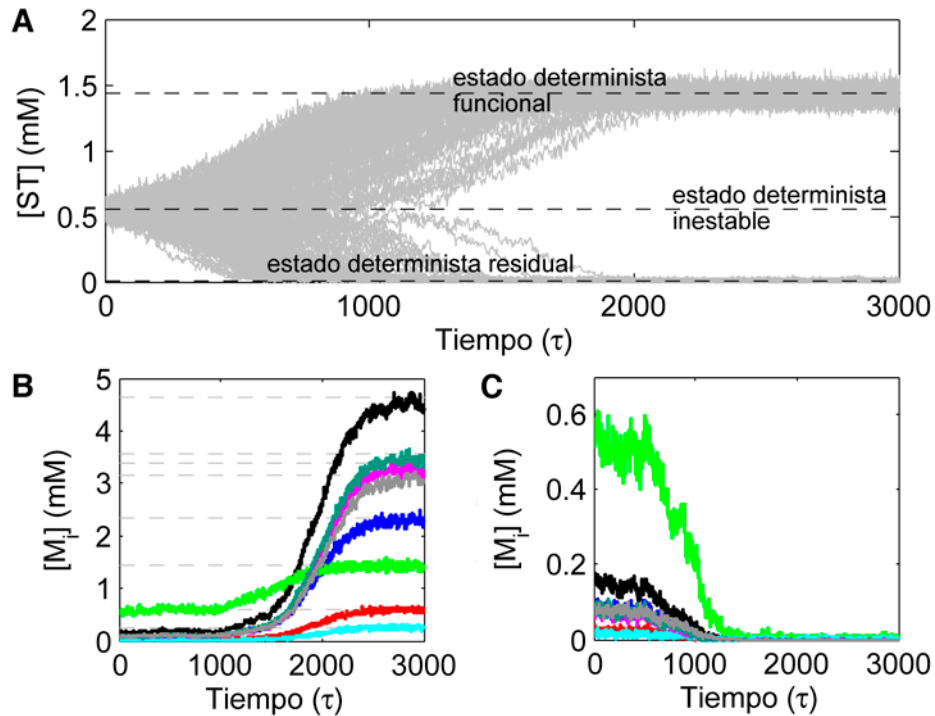


Figura 5.5 Evolución temporal de la concentración de intermediarios para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ y $V = 10^{-18} \text{ L}$. Trescientas simulaciones independientes fueron realizadas, partiendo como condición inicial de los tamaños poblacionales correspondientes a las concentraciones de estado estacionario inestable determinista, un punto silla donde $[STU] = 0.027$, $[STUS] = 0.088$, $[STUST] = 0.159$, $[ST] = 0.552$, $[SU] = 0.017$, $[SUST] = 0.086$, $[SUSTU] = 0.079$, $[STUSU] = 0.091 \text{ mM}$. (A) Resumen de la evolución temporal de la concentración de ST obtenida en las distintas simulaciones. Aproximadamente la mitad de las simulaciones terminan en un régimen automantenido, con poblaciones de intermediarios que fluctúan alrededor del estado determinista funcional, y la otra mitad en torno al estado determinista residual, con mínimas concentraciones de metabolitos. La evolución temporal de la concentración de los distintos intermediarios se detalla para una de las simulaciones que termina alrededor del estado funcional (B) y para otra que termina alrededor del estado residual (C). Tras un tiempo suficientemente largo, todas las concentraciones fluctúan en torno a valores promedio constantes que coinciden con las concentraciones correspondientes de estado estacionario determinista (líneas discontinuas).

5.3.2 Diagramas de bifurcación estocástico

A partir de las distribuciones de tamaños poblacionales de intermediarios que resultan tras un tiempo relativamente largo de simulación (3000τ) con los distintos valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$, se ha construido un diagrama de bifurcación estocástico. El fin es ilustrar el comportamiento de la distribución estacionaria, y en particular de los estados residual y funcional estocásticos, a medida que cambian las velocidades de degradación de los catalizadores. Con ello se pretende favorecer la comparación tanto con los resultados del análisis determinista como con aquellos del análisis estocástico del modelo anterior (ver Figura 4.4).

La Figura 5.6 ilustra, en el espacio de parámetros explorado, con círculos y barras de error verticales el valor promedio y desviación típica alrededor de ambos estados estocásticos residual y funcional⁴². A su vez, en líneas coloreadas se muestran los valores de concentración de los estados estacionarios hallados con la metodología determinista, provenientes de la Figura 5.2. Se comprueba que para las distintas condiciones de las constantes cinéticas de degradación, los dos estados estocásticos (modos posibles de la distribución a tiempo suficientemente largo) se localizan sobre sus respectivas soluciones deterministas.

Debe recordarse que en la región en la que la distribución estocástica adquiere carácter bimodal, no se dispone de información sobre las proporciones estacionarias que corresponden a uno y otro modo. Como ya se ha explicado antes, con el volumen del sistema analizado ($V = 10^{-18} \text{ L}$), en la escala de tiempo considerada sólo se obtienen distribuciones cuasiestacionarias. No obstante, en su lugar, sí pueden indicarse cómo son las probabilidades de alcanzar los estados alternativos a tiempos relativamente cortos. Así pues, al igual que se hiciera con el modelo del capítulo precedente, la figura incluye en trazo discontinuo las curvas de isoprobabilidad 95% y 5%, que corresponden con aquellos valores de concentración inicial para los que se obtiene una probabilidad del 95% y del 5% respectivamente de alcanzar el estado funcional a tiempos relativamente cortos. Nuevamente, estas curvas se sitúan a ambos lados del estado estacionario determinista inestable y sirven como estimación de los límites de la región del espacio fase de mayor inestabilidad, que es precisamente la responsable de mantener alejados ambos modos y de que la distribución resulte tan marcadamente bimodal.

Por supuesto, la existencia de una región de monoestabilidad del estado funcional para valores relativamente bajos de las constantes cinéticas de degradación (Figura 5.6, a la izquierda) sigue siendo la diferencia más notoria con respecto al diagrama de bifurcación (estocástico) obtenido con el modelo previo (ver Figura 4.4). Surgen las mismas apreciaciones planteadas con el análisis determinista: es evidente que ahora (ya sea en ausencia o presencia de ruido) el sistema es capaz de emerger *de novo* a partir de una situación de ausencia total de sus metabolitos si $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$. En cambio, el rango de valores de los parámetros en el que el sistema puede automantenerse en un estado operativo es, a fin de cuentas, prácticamente el mismo, se consideren las reacciones no catalizadas de síntesis o no⁴³. Como estas cuestiones ya han sido discutidas anteriormente (Apartado 5.2.1), no se incidirá más sobre ellas.

Existen adicionalmente dos particularidades sutiles del diagrama de bifurcación estocástico actual que merecen la pena ser tratadas. Por una parte, así como los estados estocásticos mostrados en la Figura 4.4 tan sólo representaban modos de distribuciones

⁴² La desviación típica en torno al estado residual es mucho menor, y por eso en la Figura 5.6 apenas son perceptibles las barras de error verticales correspondientes.

⁴³ Los valores promedio de concentración de ST y del resto de metabolitos en el estado funcional resultan también muy semejantes con un modelo y con el otro.

cuasiestacionarias, aquí, en la Figura 5.6, corresponden con modos de distribuciones estacionarias. Concretamente, el estado funcional o de coexistencia de poblaciones relativamente altas de intermediarios antes era transitorio (metaestable), mientras que ahora es un estado propiamente estable. Por otra parte, al presentarse dos puntos de bifurcación en lugar de uno, aparecen consistentemente, correspondiendo con los márgenes de la región de biestabilidad determinista, no una sino dos zonas de incertidumbre en las que el comportamiento estocástico es difícil de precisar a tiempos relativamente largos (Figura 5.6, regiones sombreadas en gris). Conforme el valor de las constantes de degradación aumenta y se aproxima al punto crítico $0.373 \tau^{-1}$, la región del espacio fase de tamaños poblacionales de mayor inestabilidad se acerca al estado funcional y la probabilidad de que las fluctuaciones alrededor de este estado provoquen la caída del sistema al estado residual se vuelve no despreciable; ciertamente, se dificulta el automantenimiento. Y la novedad es que ahora, del mismo modo, conforme el valor de $k_4 = k_8 = k_{11}$ se aproxima a $0.221 \tau^{-1}$, sucede lo contrario: la zona de incertidumbre se dirige hacia el estado residual y se diluye el carácter bimodal de la distribución en favor del estado funcional, es decir, se favorece la recuperación del sistema. Ambos aspectos pueden tener importantes repercusiones de cara al comportamiento del sistema en volúmenes pequeños, por lo que es conveniente revisar si se mantienen las premisas de la existencia de un volumen crítico.

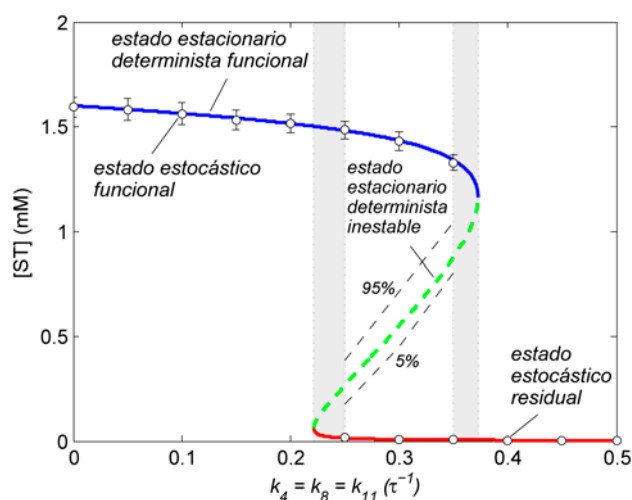


Figura 5.6 Diagrama de bifurcación estocástico obtenido frente al valor de las constantes cinéticas de degradación, $k_4 = k_8 = k_{11}$. Los estados residual y funcional estocásticos han sido obtenidos a partir de múltiples simulaciones independientes realizadas para $V = 10^{-18}$ L como los modos de la distribución de tamaños poblacionales a un tiempo suficientemente largo (3000τ). Cada estado queda descrito por un valor promedio y una desviación típica, que aquí se ilustran como círculos con barras de error verticales y quedan superpuestos sobre los valores de concentración de las soluciones estacionarias deterministas (líneas coloreadas). Por encima y por debajo del estado estacionario determinista inestable se sitúan las curvas de isoprobabilidad 95% y 5% (líneas negras discontinuas), que recogen el conjunto de valores de $[ST]$ correspondientes a condiciones iniciales que en los experimentos de simulación producen frecuencias relativas de 0.95 y 0.05 de ir al estado funcional a tiempos relativamente cortos. Las dos franjas sombreadas en gris señalan aquellas regiones próximas a los puntos críticos en las que es probable la transición de poblaciones de intermediarios de un estado al otro de la distribución y es difícil precisar el comportamiento del sistema a tiempos relativamente largos (ver texto).

5.3.3 ¿Existe un volumen crítico?

El capítulo anterior finalizaba con la descripción de un volumen crítico por debajo del cual el sistema colapsaba en un corto periodo de tiempo y no era viable su automantenimiento. La cuestión, ahora que se plantea el esquema de reacciones incluyendo los procesos no catalizados de

síntesis, es: ¿sigue el sistema siendo sensible al volumen de confinamiento? ¿Pueden las altas fluctuaciones asociadas a pequeños volúmenes ser capaces de dismantelar por completo el sistema en operación, o al menos de provocar en un cierto intervalo corto de tiempo una reducción drástica de las concentraciones de los metabolitos a valores residuales, lejanos del óptimo de funcionamiento? Tal como se procediera con el modelo previo, se han planteado varios experimentos con distintos volúmenes del sistema, realizando en cada caso múltiples simulaciones independientes a partir de condiciones iniciales lo más cercanas posible a los valores de concentración del estado estacionario determinista funcional.

Se han aplicado las mismas consideraciones que en el capítulo anterior para la conversión de las concentraciones de interés en poblaciones moleculares, con objeto de asegurar condiciones experimentales semejantes, aunque en este caso ello ha precisado modificar ligeramente el algoritmo de simulación para adecuarlo a las circunstancias. Para volúmenes del sistema relativamente grandes ($V \geq 10^{-19}$ L), el tamaño de población inicial de cada metabolito en las distintas simulaciones es el mismo, y se asigna por redondeo al número de moléculas más próximo a su concentración de estado estacionario determinista funcional. Pero para volúmenes pequeños ($V < 10^{-19}$ L), la población inicial de cada metabolito en cada simulación se asigna a un valor aleatorio de una distribución de Poisson centrada en el valor (no entero) correspondiente a la concentración de estado estacionario determinista; en el caso de los metabolitos externos, su concentración se considera constante, pero su población se actualiza en cada paso de simulación con un valor aleatorio distinto escogido de su distribución de Poisson, simulándose un reparto aleatorio del pool de moléculas entre los distintos sistemas de reacción independientes (ver Apartado 4.3.1). Este procedimiento, si bien constituye un mecanismo eficaz para evadir el sesgo del redondeo con tamaños poblacionales muy pequeños, introduce inevitablemente un nuevo sesgo que, dadas las peculiaridades del modelo actual, es importante controlar para evitar comportamientos artificiosos, como se razona a continuación.

Para volúmenes muy pequeños, los tamaños poblacionales, aun aquellos que corresponden a las concentraciones de estado estacionario determinista funcional, son también muy bajos, y podría coincidir que en un determinado momento de simulación tanto las poblaciones de los diversos metabolitos como las de los tres precursores (que fluctúan según sus respectivas distribuciones de Poisson) adquirieran valor cero. En tal caso, todas las probabilidades de transición por unidad de tiempo de abandonar dicho estado trivial se volverían iguales a cero. Y el problema es el siguiente: por más que la población de S, T y U se actualice en cada paso de simulación, como en el método de Gillespie el paso de tiempo (o tiempo que transcurre hasta nuevo evento) depende de manera inversa de la suma de las probabilidades de transición por unidad de tiempo (ver Ecuación 4.4 en la Caja 4.1), éste se volvería infinito sin que sucedieran por tanto más eventos. Es decir, el sistema permanecería en el estado trivial de modo indefinido, como si de una barrera absorbente se tratara. Este efecto obviamente no plantea inconvenientes con el modelo del capítulo previo, pero no es asumible cuando existen reacciones no catalizadas de síntesis, que podrían operar esporádicamente aun cuando sólo existen trazas de los precursores⁴⁴.

⁴⁴ Por muy desplazada que pudiera estar la distribución de Poisson de los precursores hacia el valor cero, siempre existirían probabilidades de explorar (transitoriamente) poblaciones no nulas de S, T ó U. Y bastaría con contar con una molécula de cada una de ellas para restablecer algunas probabilidades de transición por unidad de tiempo distintas de cero (aquellas que corresponden con procesos no catalizados de síntesis) y posibilitar así la aparición temporal de algún metabolito. La cuestión es que las poblaciones de los precursores dejan de actualizarse llegado el caso en el que tanto estas especies como las demás restantes estén temporalmente extinguidas dentro del volumen del sistema, cuando deberían poder seguir actualizándose, ya

La manera de resolver el problema y hacer que el recambio (actualización) del número de moléculas de precursores sea efectivo dentro del volumen de reacción ha consistido en forzar el algoritmo para que cuando todas las probabilidades de transición por unidad de tiempo valgan cero, el paso de tiempo sea muy largo pero no infinito⁴⁵. Esto se hace asignando en tales casos un paso de tiempo equivalente al que correspondería a la probabilidad de transición total no nula más pequeña posible (la relativa a una situación con sólo una molécula de aquel precursor con menos influencia). Por supuesto, esta decisión es un tanto arbitraria, pero a efectos del problema que nos ocupa, se trata de una aproximación razonable que consigue eludir de manera sencilla ambos sesgos y por tanto estudiar el efecto del volumen adecuadamente. En todo caso, todo este asunto no demuestra sino la precaución que hay que tomar a la hora de trasladar las consideraciones previas y supuestos de simulación de un modelo al otro.

Una vez aclaradas las aproximaciones que se consideran para la simulación, en primer lugar se ha analizado el efecto del volumen del sistema sobre el comportamiento dinámico en aquel rango de valores de las constantes cinéticas de degradación para el que se admitían dos modos posibles de tamaños poblacionales: residual y funcional. La Figura 5.7 resume los resultados obtenidos para $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. Así como a volúmenes relativamente grandes las poblaciones de metabolitos se mantienen durante todo el tiempo de estudio (3000τ) fluctuantes en torno al estado funcional, a volúmenes muy pequeños el sistema es incapaz de persistir alrededor de dicho estado, y las poblaciones moleculares se dirigen rápidamente hacia la extinción (antes de 3000τ): el sistema se dismantela. Se mantiene por tanto la noción de un cierto volumen crítico V_c que es necesario superar para que el sistema se automantenga. Éste queda patente al extender el análisis a múltiples volúmenes y representar en cada caso el valor que toma la media muestral de concentración de ST a tiempo final (Figura 5.7B). Como se observa en la figura, queda comprendido en una franja relativamente estrecha de valores de volúmenes, $1.2 - 4 \times 10^{-20} L$, que además coincide prácticamente con el rango observado para el volumen crítico con el modelo original, en ausencia de reacciones no catalizadas de síntesis.

Conviene discutir al menos dos aspectos en relación con estos resultados. En primer lugar, de acuerdo con los modos posibles de la distribución estocástica, cabría esperar que por debajo del volumen crítico el sistema se dirigiera a un estado de poblaciones residuales de intermediarios. Sin embargo se observa que finaliza en un estado de extinción completa. La explicación es sencilla: las concentraciones de metabolitos características del estado estacionario determinista residual son tan bajas, que en los volúmenes considerados corresponden con poblaciones nulas. En segundo lugar, y quizá más importante, en el modelo actual no existen barreras absorbentes. Esto significa que a pesar de que el sistema pueda extinguirse por completo en un determinado momento, deberían seguirse produciendo fluctuaciones que provocaran al menos pequeñas salidas esporádicas de las poblaciones por encima del estado trivial. Lo cierto es que aunque las consideraciones de simulación ahora contemplan la posibilidad de este tipo de eventos, las fluctuaciones alrededor del

que su recambio se concibe como un proceso continuo que considera implícitamente su difusión desde un medio externo donde sí están disponibles.

⁴⁵ Una alternativa quizá más natural hubiera sido incluir explícitamente en la matriz de posibles eventos los procesos de difusión de los precursores desde un medio externo al volumen de reacción. Las probabilidades de transición por unidad de tiempo asociadas a estos procesos no podrían valer cero, de modo que se aseguraría que el paso de tiempo en las simulaciones fuera siempre finito y el tamaño poblacional de los precursores se renovara periódicamente dentro del sistema, independientemente de si éste atravesara por unos estados u otros. Este modo de proceder, algo más elaborado, forma parte del método habitual de cálculo implementado con la plataforma de simulación ENVIRONMENT (ver Material y Métodos), y será empleado en capítulos posteriores. De momento, para los propósitos que perseguimos aquí, basta con la aproximación que se describe en el texto.

estado residual son de muy baja magnitud y en las condiciones de estudio difícilmente involucran la aparición de algo más que una molécula de una sola especie. Por tanto son insignificantes como para modificar el comportamiento en la escala de tiempo considerada. Ahora bien, el hecho de que la extinción no sea irrevocable tendrá importantes implicaciones para el comportamiento a grandes escalas temporales.

Es de esperar que al igual que sucedía con el modelo original, el tiempo de simulación afecte al valor del volumen crítico. Esto es lógico si se admite que el sistema no tiene límites para desplazarse libremente por el espacio fase de posibles tamaños poblacionales. Obviamente, la probabilidad de extinción a un determinado tiempo dependerá de la magnitud de las fluctuaciones. A pequeños volúmenes las fluctuaciones alrededor del estado funcional son tales que pueden traspasar con facilidad la región del espacio fase de mayor inestabilidad y provocar que las poblaciones abandonen rápido la zona de dominio del estado estocástico funcional para dirigirse hacia la de atracción del estado estocástico residual, con valores poblacionales nulos o muy próximos a cero. A volúmenes más grandes, situados por encima del límite de volumen crítico observado, la magnitud de las fluctuaciones en torno al estado funcional es menor y por tanto la probabilidad de extinción a tiempos relativamente cortos es muy baja (no se observan fenómenos de extinción o pérdida masiva de metabolitos durante el tiempo de estudio). Sin embargo, la probabilidad de extinción crecerá a medida que se consideren tiempos más largos: es cuestión de tiempo que se produzca una cadena de eventos capaz de dismantelar el sistema. ¿Significa esto que, independientemente del volumen de confinamiento, cuando $t \rightarrow \infty$ el sistema sólo podrá hallarse en un estado de extinción?

Como ya se ha mencionado, a pesar de todas las similitudes que presentan los resultados de la Figura 5.7 con respecto a los del Apartado 4.3.6, la extinción no es irrevocable. Consecuentemente, del mismo modo que las fluctuaciones alrededor del estado funcional pueden conducir a la extinción si logran atravesar la zona intermedia de mayor inestabilidad, las fluctuaciones sobre el estado residual o de extinción podrían provocar el efecto contrario, la recuperación del sistema, si traspasan esa región. Esta idea ya ha sido prefigurada al suponerse la existencia de dos zonas de incertidumbre en el diagrama de bifurcación de la Figura 5.6. En esencia, puede afirmarse que cuando $t \rightarrow \infty$ el sistema habrá experimentado tanto fenómenos de extinción como de recuperación. Basta recordar que la distribución estacionaria estocástica es en esta región de los parámetros bimodal (por lo que es lógico que se produzcan redistribuciones de las frecuencias entre ambos modos). Ahora bien, la cuestión es en qué medida puede afectar todo ello a la noción de un volumen crítico.

En la práctica, las fluctuaciones alrededor del estado residual suceden con muy poca frecuencia y son de muy baja magnitud en comparación con las que se producen en torno al estado funcional, de modo que se requerirían tiempos de simulación mucho más largos para observar fenómenos de recuperación que de extinción. Y esto es así independientemente del volumen considerado^{46,47}. Dicho de otro modo, por lo general la recuperación en esta región de los

⁴⁶ El tiempo necesario para la extinción aumentará de nuevo de modo muy abrupto con el volumen del sistema considerado, pero también sucederá lo mismo con el tiempo necesario para la recuperación.

⁴⁷ Únicamente en aquella zona de los parámetros inmediatamente próxima al punto de bifurcación $0.221 \nmid$ la recuperación podrá ser más frecuente que la extinción. Pero se trataría de una franja de valores de los parámetros tan estrecha, que puede despreciarse del análisis global de la región $0.221 \nmid < k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \nmid$. Hay que tener en cuenta que las dos franjas grises mostradas en la Figura 5.6 sólo fueron añadidas con fines ilustrativos, para indicar esquemáticamente la localización aproximada de las zonas de incertidumbre, pero que la anchura real correspondiente a la zona de incertidumbre izquierda sería mucho más estrecha que la de la derecha, al margen de que ambas se ensancharan al considerar progresivamente

parámetros no puede aportar más valor que el de provocar que muy ocasionalmente aparezcan periodos cortos de coexistencia de poblaciones no nulas, intercalados con largos periodos de extinción. Esto no significa sino que el modo predominante en la distribución estacionaria estocástica será el correspondiente al estado residual. Por lo tanto, en definitiva sigue teniendo sentido preservar la noción de un cierto volumen crítico a escalas de tiempo químicas: el sistema sólo será viable en la medida en la que las fluctuaciones sean bajas y le permitan mantenerse alejado de la extinción.

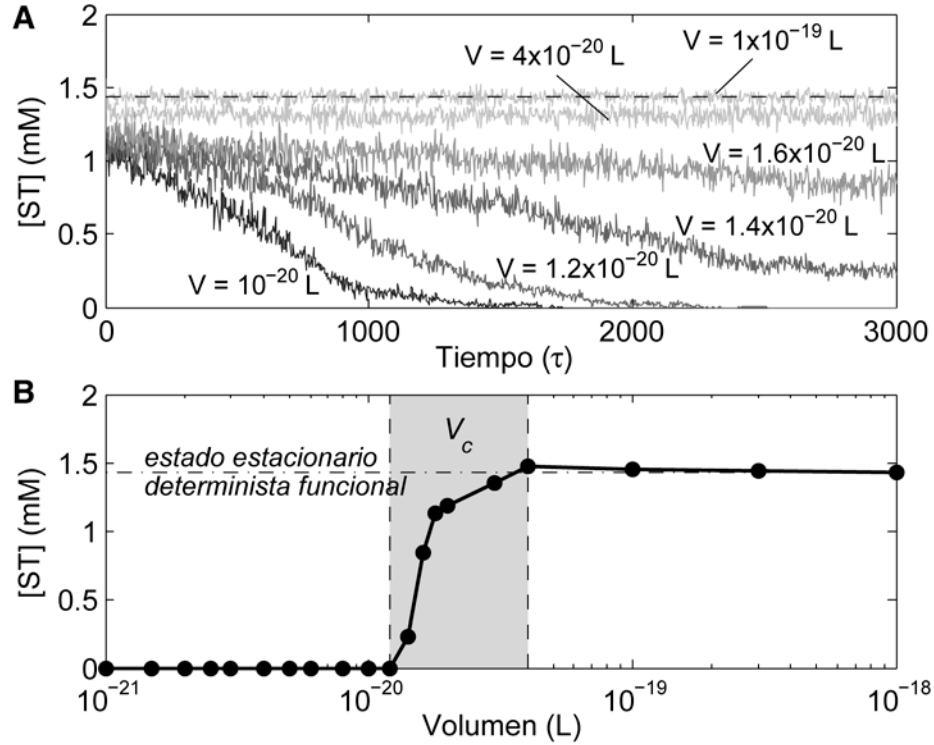


Figura 5.7 Efecto del tamaño finito de población sobre la capacidad de mantenimiento de concentraciones de metabolitos en torno al estado funcional. Para cada valor de volumen del sistema, múltiples simulaciones independientes se han realizado partiendo de condiciones iniciales lo más cercanas posible a las concentraciones del estado estacionario determinista funcional. (A) Se muestra la evolución temporal de la media muestral de concentración de ST obtenida con diversos volúmenes del sistema. En todos los casos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. (B) El valor de la media muestral de concentración de ST a tiempo 3000 τ se representa en función del volumen. El resultado depende de la magnitud relativa de las fluctuaciones. Por debajo de un cierto volumen crítico V_c (es decir, con bajas poblaciones moleculares), el sistema colapsa rápidamente y los valores de concentración de ST terminan próximos a cero (si no en cero). En cambio, para volúmenes superiores, con mayores tamaños poblacionales, el efecto relativo de las fluctuaciones es menor y el sistema se mantiene, al menos durante el tiempo de estudio, con concentraciones de metabolitos fluctuantes en torno a los valores del estado estacionario determinista funcional.

Por último, también se ha explorado el efecto del volumen del sistema en el espacio de parámetros en el que $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$. Como era de esperar, en este caso el comportamiento resulta bastante más sencillo. La solución estacionaria estocástica ahora ya no admite un estado residual; se trata de una distribución unimodal centrada únicamente sobre el estado funcional, sobre concentraciones relativamente altas de los metabolitos. Por tanto, al no haber bimodalidad ni existir tampoco una región intermedia del espacio fase especialmente

volúmenes más pequeños. Por otro lado, el comportamiento en este estrecho margen izquierdo será más parecido al que pueda estudiarse más adelante para $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$.

inestable, no se detectan fenómenos de recuperación o de extinción inducidos por ruido interno, efectos de tamaño poblacional finito. En consecuencia, aquí no se puede hablar de un volumen crítico. En todo caso el sistema se comporta como ergódico y a medida que el volumen disminuye aumenta la magnitud de las fluctuaciones en torno al estado funcional, pero no existen condicionantes de volumen que limiten la capacidad de automantenimiento.

Como conclusión, la inclusión de las reacciones no catalizadas de síntesis no modifica sustancialmente la sensibilidad del sistema a las velocidades de degradación de sus catalizadores, pero sí en cierta medida la sensibilidad al volumen de confinamiento, en el sentido de que si logra mantener valores de las constantes cinéticas de degradación suficientemente bajos, deja de existir un volumen crítico. Aun así, es bien probable que las condiciones de máxima eficacia en la velocidad de operación se sitúen en la región en la que la capacidad de automantenimiento a tiempos relativamente largos todavía es dependiente del tamaño del sistema (ver Apartado 3.4.4), por lo que el volumen aún es un factor a tener en cuenta para evaluar la viabilidad a escalas de tiempo prebióticas. Sin embargo, no puede obviarse que tanto la plasticidad frente al volumen como el hecho de poderse autoconstruir de cero cuando $k_1 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$ pueden significar una gran ventaja a la hora de explicar la emergencia del sistema en condiciones prebióticas.

Capítulo 6

6 Propiedades físicas del compartimento prebiótico: efectos del cambio de composición de la membrana

Un hecho fundamental en el origen y primeras etapas de desarrollo de la organización biológica debió ser la formación espontánea de algún tipo de compartimento alrededor de una cierta red de reacciones protometabólicas, que permitiera contener y preservar la integridad del metabolismo subyacente. Como se mencionó en la Introducción, el compartimento debió sufrir un largo proceso de evolución hasta ir adquiriendo el aspecto y composición de las biomembranas actuales. A lo largo de este proceso, los compartimentos primitivos, que en su origen serían presumiblemente vesículas formadas por el autoensamblaje de compuestos anfifílicos sencillos disponibles en la Tierra primitiva, irían enriqueciéndose progresivamente en lípidos y compuestos más complejos (de síntesis interna). Pero al mismo tiempo, estas sucesivas conversiones de la composición de la membrana debieron provocar cambios en sus propiedades físicas (en la estabilidad, permeabilidad a nutrientes, etc.), que habrían impuesto nuevas restricciones en la dinámica del protometabolismo interno, y que por tanto pudieron comprometer el funcionamiento y estabilidad global del sistema. Surgen por tanto dos preguntas complementarias: ¿Qué consecuencias físico-químicas supuso el desarrollo del incipiente protometabolismo dentro de un compartimento prebiótico? ¿Qué posibles repercusiones dinámicas pudieron tener sobre los procesos químicos prebióticos los primeros cambios o transiciones en la composición de las membranas primitivas?

Hasta ahora, con el modelo protometabólico que se viene elaborando en los capítulos precedentes ya se han considerado de manera teórica ciertos factores que influyen en la capacidad de automantenimiento del sistema (algunos incluso relacionados con la compartimentación, como el volumen de confinamiento), pero no se ha contemplado todavía expresamente un escenario en el que el sistema se encuentre encapsulado en un compartimento prebiótico, que permita analizar el efecto del compartimento sobre el comportamiento global del sistema. Para poder abordar esta cuestión, que será tratada más adelante, es conveniente realizar primeramente un cuidadoso estudio experimental de vesículas formadas con diversas mezclas de compuestos anfifílicos sencillos, con el fin de esclarecer en la medida de lo posible qué propiedades físicas presentarían los compartimentos prebióticos y cómo cambiarían éstas al modificarse la composición de la

membrana. En este capítulo se analizan algunas propiedades dinámicas de estas membranas vesiculares *in vitro*, relacionadas con su estabilidad y permeabilidad, factores críticos para el desarrollo y automantenimiento de los primeros sistemas protoceulares.

6.1 Modelo experimental

En este estudio se ha escogido como sistema experimental modelo de compartimento prebiótico vesículas formadas por ácido dodecanoico o ácido láurico (LA) (Figura 6.1), un ácido graso saturado de doce carbonos que se considera disponible en condiciones prebióticas. Manteniendo este tipo de vesícula como referencia principal y punto de partida de los experimentos, adicionalmente se han analizado vesículas de composición mixta, constituidas por diversas combinaciones binarias de LA con ciertos compuestos anfífilicos derivados de este. Concretamente, se han escogido moléculas que difieren en el grado de complejidad de la cabeza polar. Esto permite que estos tipos vesiculares puedan representar (aunque de modo muy simplificado) distintos estadios intermedios por los que pudieron pasar las membranas primitivas en su camino hacia las membranas actuales, a medida que los ácidos grasos de relevancia prebiótica fueran yendo sustituidos por lípidos más complejos de síntesis interna (en última instancia fosfolípidos)⁴⁸. Así pues, se han realizado mezclas de ácido láurico con su derivado alcohol, el dodecanol (LA/LOH); mezclas de ácido láurico con su derivado glicerol, el monolaurilglicerol o monolaurina (LA/GML); y mezclas de ácido láurico con su derivado fosfolípido de doble cadena, la dilaurilfosfatidilcolina (LA/DLPC)⁴⁹. Las estructuras moleculares de estos compuestos se presentan en la Figura 6.1.

Debe reconocerse que el estudio de vesículas formadas por mezclas binarias de lípidos es muy limitado para precisar las propiedades de los compartimentos primitivos (cuya composición debió ser bastante más heterogénea), como se tratará en la Discusión. No obstante, sirve de guía para hacer una primera tentativa del espectro de posibles cambios en las propiedades físicas que admitiría la membrana de un compartimento primitivo en sus primeras fases de transformación. Además, este trabajo añade la novedad de que las vesículas de composición mixta han sido preparadas a diversas concentraciones relativas de sus componentes. Esto es idóneo para comprender en detalle el impacto del cambio de composición de membrana en la estabilidad y permeabilidad vesicular, y así dilucidar qué factores o mecanismos moleculares son responsables de los cambios en las propiedades físicas de la membrana. Todo ello justifica más si cabe el uso de mezclas binarias.

⁴⁸ Obviamente, los cambios evolutivos sufridos en la composición lipídica de las membranas primitivas habrían sido bastante más complicados. Entre otros aspectos pudieron involucrar no sólo un aumento del tamaño y complejidad de las cabezas polares lipídicas, sino una progresiva elongación de las cadenas de acilos, la aparición de insaturaciones, etc. Por otro lado, aunque este estudio se limita al ácido láurico, solo o en combinación con cada uno de sus derivados, es realista pensar que las membranas primitivas estarían más probablemente compuestas por mezclas de múltiples tipos de compuestos anfífilicos disponibles en el entorno, pudiendo mantener también en fases intermedias de su evolución moléculas de muy diverso grado de complejidad. En cualquier caso, aunque resulte muy simplificador, una secuencia en la que la membrana de ácidos grasos se enriqueciera primero en sus derivados alcoholes, luego en acilgliceroles, y posteriormente fuera sustituida por fosfolípidos de longitudes progresivamente mayores, es la línea evolutiva razonable que proponen algunos autores (Monnard y Deamer, 2002).

⁴⁹ A partir de ahora en el texto se utilizarán con frecuencia las abreviaturas para designar la composición de las vesículas mixtas. Por ejemplo, LA/GML 2:1 significa una mezcla de ácido láurico y monolaurina en proporciones de concentración molar relativas 2 a 1, por tanto más enriquecida en láurico.

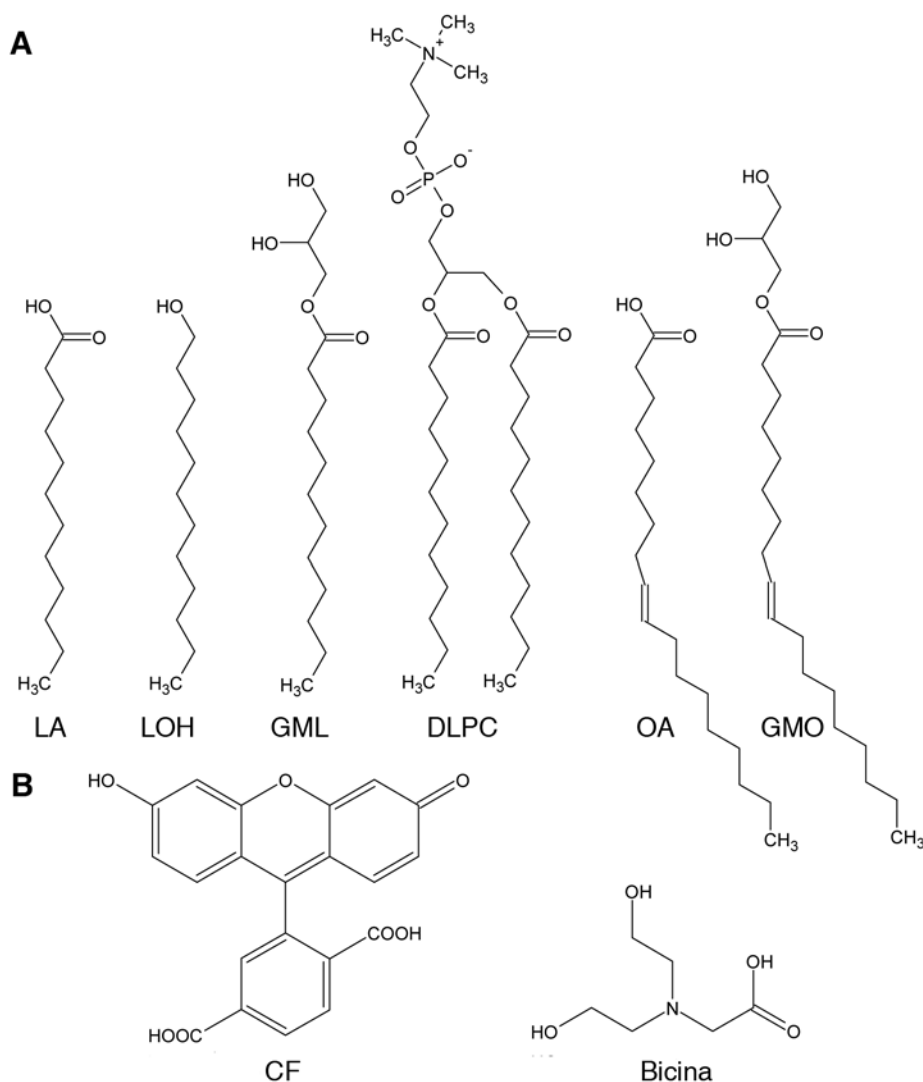


Figura 6.1 Estructura química de los compuestos utilizados en los experimentos *in vitro*. (A) Moléculas anfifílicas usadas en la formación de vesículas en bicapa. LA: ácido dodecanoico o ácido láurico; LOH: 1-dodecanol; GML: 1-monolauril-glicerol o monolaurina; DLPC: 1,2-dilauroil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina; OA: ácido *cis*-9-octadecenoico o ácido oleico; GMO: 1-monooleil-glicerol o monooleína. (B) CF: 5-carboxifluoresceína, usada como fluoróforo; bicina o bis(2-hidroxietil)-glicina, usada como tampón.

Al margen de los tipos de vesículas antes mencionados, también se han preparado vesículas formadas por mezclas de ácido oleico (18 carbonos, una insaturación) con su derivado glicerol, el monooleil-glicerol o monooleína (OA/GMO) (Figura 6.1). El OA, a diferencia del LA, no es de relevancia prebiótica (precisamente por su insaturación a mitad de la cadena hidrofóbica y su mayor longitud), pero dada la facilidad para su uso experimental, ha sido extensamente estudiado como molécula modelo. Por ejemplo, en combinación con el GMO en una relación molar 2:1 forma vesículas relativamente estables (Monnard y Deamer, 2002; Maurer et al., 2009). Éstas sirven como referencia de un compartimento primitivo algo más evolucionado, pero fundamentalmente se han empleado como control de validación para la puesta a punto de un protocolo de preparación de vesículas de composición mixta.

6.1.1 Diseño y puesta a punto de un protocolo de preparación de vesículas de composición mixta

Todos los tipos de vesículas han sido preparados siguiendo el método general de vesiculación inducida por pH (ver Material y Métodos). En todos los casos se ha mantenido como referencia el procedimiento desarrollado por Maurer et al. (2009) para la preparación de vesículas mixtas de ácidos grasos y derivados gliceroles, pero se ha prestado especial atención en evitar en la medida de lo posible la precipitación de los compuestos anfifílicos y en maximizar la producción de vesículas. Así, se han incluido varios pasos de calentamiento de la muestra y agitación con Vortex, así como un paso de sonicación para asegurar el correcto mezclado de los compuestos anfifílicos. Una vez que este nuevo procedimiento ha sido validado para la preparación de vesículas de OA/GMO, se ha aplicado al resto de sistemas experimentales, que apenas han sido explorados en trabajos previos. Aunque en realidad, dentro de estas directrices generales, cada tipo vesicular ha requerido el diseño y puesta a punto de un protocolo específico adaptado a las características de sus componentes (Caja 6.1). A continuación se describen las principales peculiaridades.

Así como la preparación de vesículas de OA/GMO se ha realizado a temperatura ambiente, la preparación de vesículas de LA (puro o en combinación con sus derivados) requiere mantener la muestra en todo momento a temperaturas elevadas, por encima de 32°C, para evitar la precipitación del LA⁵⁰. En cuanto al pH, las muestras de OA/GMO se han fijado a un pH final de 9.10 (próximo al pK_a aparente del OA descrito en la literatura). En las dispersiones que contienen LA, el pH final de preparación sólo se ha establecido una vez que se ha comprobado experimentalmente el valor de su pK_a aparente (ver Apartado siguiente)⁵¹.

En la preparación de vesículas de composición mixta LA/LOH, el LOH se añade una vez que el pH se ha incrementado, con objeto de favorecer su mezclado con el LA, que en tales circunstancias se presenta desprotonado. La formación de vesículas se produce directamente a pH alcalino, aunque el pH se baja posteriormente a 8.50 con objeto de maximizar el número de vesículas.

En el caso del sistema LA/DLPC, el protocolo comienza con la disolución y mezclado de los componentes en una solución orgánica (cloroformo), seguida de la evaporación del solvente para conseguir una película fina de lípido que ya sí se resuspende en la disolución final acuosa de tampón bicina. Este procedimiento, comúnmente utilizado en la preparación de vesículas de fosfolípidos (liposomas), es eficaz cuando existen componentes difícilmente miscibles en agua, y se ha escogido para este caso, considerando que el DLPC es relativamente más hidrofóbico que el resto de derivados utilizados.

Por último, conviene aclarar que para la realización de ciertos experimentos se han introducido pequeñas variaciones en el protocolo de formación de vesículas, en cuyo caso las modificaciones se describen en el apartado correspondiente.

⁵⁰ El punto de fusión del LA es 43°C. Una vez hidratado, presenta una temperatura de transición de fase de la bicapa (entre líquido-cristalino o L_α y fase gel o L_β) de 32°C. Por debajo de dicha temperatura (por ejemplo a temperatura ambiente) precipita y las vesículas que forma se vuelven inestables.

⁵¹ Aunque existen trabajos previos en los que se ha determinado el valor del pK_a aparente del LA, es preferible calcularlo de nuevo para las condiciones experimentales utilizadas. En concreto, aquí las muestras se mantienen a 40°C. Como el pH varía dependiendo de la temperatura, el valor de pK_a puede ser también distinto del de otros trabajos en los que se emplee otra temperatura. Y la preparación de las vesículas a un pH alejado del pK_a aparente puede motivar una disminución de su estabilidad, como se verá en el Apartado siguiente.

Caja 6.1: Protocolos de preparación de vesículas lipídicas

Preparación de vesículas de composición mixta LA/GML*:

1. Preparar la cantidad deseada de ambos compuestos anfífilicos.
2. Resuspender los compuestos anfífilicos (precalentados hasta su fusión) en una disolución precalentada de bicina 100 mM.
3. Calentar la mezcla unos segundos con un secador. Vortex 1 min.
4. Mantener la muestra en un baño a 40°C. Mientras, incrementar el pH poco a poco con sucesivas adiciones de NaOH 1 M, hasta exceder pH 9.
5. Calentar de nuevo la muestra unos segundos con el secador. Vortex 1 min. Sonicación 15 min a 40°C.
6. Disminuir lentamente el pH con varias alícuotas de HCl 1 M, hasta pH 8.00 (muestra siempre a 40°C). Ajustar con agua el volumen final a 4 mL.
7. (Comprobar la existencia de agregados vesiculares por microscopio de fluorescencia, utilizando el colorante lipofílico Rojo Nilo).

Preparación de vesículas de composición mixta LA/DLPC:

1. Preparar la cantidad deseada de ambos compuestos anfífilicos y disolverlos en 0.4 mL de cloroformo.
2. Secar la muestra por completo en una campana de vacío (overnight).
3. Resuspender la película restante (precalentada hasta su fusión) en una disolución precalentada de bicina 100 mM.
4. Seguir el mismo protocolo que con mezclas LA/GML (puntos 3 al 7).

* Las vesículas puras de LA así como las de composición mixta LA/LOH se preparan de modo semejante a las de LA/GML, aunque en el caso de las de LA/LOH, el LOH se añade sólo una vez que se ha incrementado el pH, es decir entre los pasos 4 y 5. Además el pH final se ha ajustado en este caso a 8.50.

6.2 Influencia de la composición en la estabilidad vesicular

6.2.1 Sensibilidad vesicular al pH

En primer lugar se ha evaluado la estabilidad vesicular a través de ensayos de agregación a distintos pH. Concretamente, el análisis se ha focalizado sobre mezclas de LA/GML con diversas concentraciones relativas de GML, aprovechando el reciente descubrimiento de un cierto efecto estabilizador de los derivados glicérols sobre las vesículas puras de ácidos grasos (Maurer et al., d2009). Así, se han preparado varias muestras, cada una conteniendo una dispersión con distinto ratio molar de LA/GML (concentración total de 60 mM) en agua. El uso de agua, en lugar de una solución de tampón bicina, permitirá en su momento determinar el valor del pK_a aparente del LA sin que interfiera en la titulación ningún otro compuesto con más de un estado de ionización, como el propio tampón (el pK_a de la bicina es 8.30).

Tras añadir sucesivas alícuotas de NaOH 1M hasta conseguir un pH inicial cercano a 10, se ha ido añadiendo HCl 1M en volúmenes de 5 μ L, alternando cada adición (tras 1 min de equilibrado en agitación) con la medida del pH y lectura en el espectrofotómetro de la absorbancia a 480 nm, como medida indirecta de la dispersión de luz en la muestra⁵². Tanto el grado de dispersión de luz como la turbidez de la muestra son indicativos de la presencia de agregados, bien sean vesículas o gotas lipídicas. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 6.2.

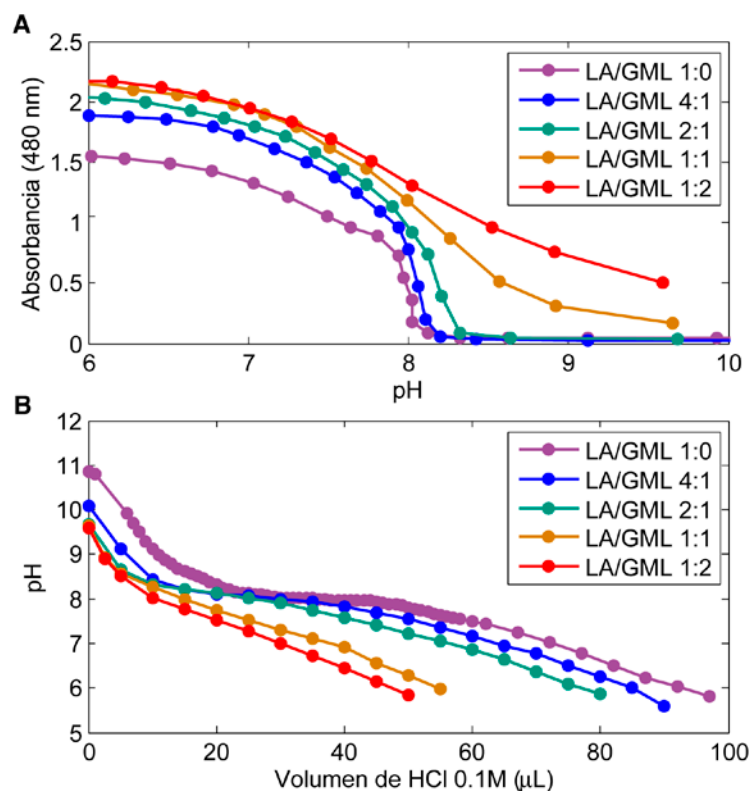


Figura 6.2 Comportamiento de las dispersiones lipídicas a distintos pH. (A) Transición de fases con el pH para distintas muestras de LA/GML en agua. La relación molar $[LA]/[GML]$ cambia entre las distintas muestras, mientras la concentración total de compuestos anfífilos permanece igual (60 mM). El progresivo enriquecimiento en GML extiende a pH alcalino el rango de formación de agregados vesiculares. (B) Curvas de titulación obtenidas a lo largo del experimento, tras las sucesivas adiciones de HCl. El punto de inflexión corresponde aproximadamente con el pK_a aparente del LA ($pK_a \approx 8.00$).

Tres estadios distintos se distinguen en el comportamiento de la dispersión de LA puro (LA/GML 1:0) conforme disminuye el pH (Figura 6.2A, línea púrpura). A pH suficientemente alto ($pH > 8.20$), la muestra es transparente. El LA se encuentra predominantemente en su forma desprotonada, de carga negativa, y forma micelas, que por su reducido tamaño no dispersan la luz. Por debajo de un cierto valor de pH, próximo a 8.20, la señal de absorbancia comienza a aumentar y la muestra adquiere un aspecto opalescente, característico de la presencia de agregados vesiculares en suspensión. El examen microscópico confirma la formación de vesículas de variados tamaños y formas (Figura 6.3). Esta formación de bicapas lamelares o vesículas se maximiza conforme el pH se aproxima al rango 7.90-8.00, con lo que aumenta más todavía la turbidez. No obstante, si la muestra se sigue acidificando ($pH < 7.80$), ésta se vuelve progresivamente más

⁵² Ninguno de los componentes de la mezcla absorbe en sentido estricto luz en el visible. Lo que sucede en los espectrofotómetros comunes es que la dispersión de parte de la luz incidente por los agregados en suspensión hace que la intensidad de luz que alcanza el detector sea menor y se interprete como absorción.

heterogénea: se forman precipitados, de aspecto grumoso. Entonces la estructura predominante pasa a ser la de gota lipídica, ya que el ácido graso se encuentra prácticamente sólo en su forma no ionizada o neutra. Esta fase de formación de gotas lipídicas se identifica con un incremento más suave de la señal de absorbancia. Hay que tener en cuenta que las gotas se forman a partir de agregados vesiculares preexistentes, que como tales, ya producían bastante dispersión de luz. Además, las sucesivas adiciones de HCl suponen cierta dilución, que contrarresta el efecto dispersivo de los grandes agregados.

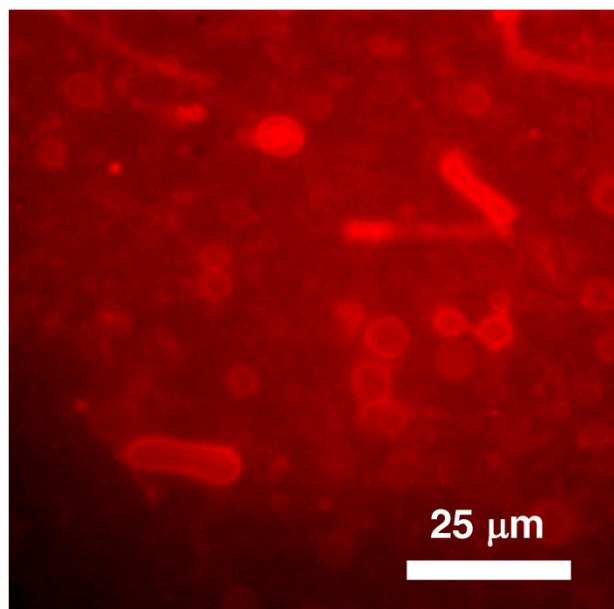


Figura 6.3 Micrografía de epifluorescencia de una dispersión acuosa de LA 60 mM a pH 8.00. Se observa la formación de estructuras vesiculares de diverso tamaño, forma y grado de lamellaridad. Flecha: Vesícula grande unilamelar (LUV). Flecha2: Vesícula grande oligolamelar. Tinción con colorante lipofílico Rojo Nilo.

A medida que la muestra se enriquece en GML, aumenta el rango de pH en el que se forman vesículas. Nótese en la Figura 6.2A cómo las curvas correspondientes a las mezclas se elongan progresivamente hacia la derecha: la dispersión de luz se prolonga a valores de pH más altos, por lo que el aumento de la señal de absorbancia se detecta antes. Por ejemplo, la muestra de LA/GML 1:2 aparece ya turbia incluso a pH 9.50, sin apenas reducir el pH. Este fenómeno consolida las observaciones previas sobre el efecto estabilizante de los derivados glicérol sobre las vesículas de ácidos grasos, y permite proponer al GML como un importante agente estabilizador de las vesículas de LA a pH alcalino.

A la vista de los resultados anteriores, se ofrece un margen relativamente amplio de valores de pH a los que poder preparar las vesículas mixtas de LA/GML. Sin embargo, siendo conscientes de la importancia que juegan el grado de ionización y de atracción de las cabezas polares de los compuestos anfífilos en la sensibilidad vesicular al pH, resulta razonable que la zona de pH próxima al pK_a aparente del ácido graso sea la de mayor estabilidad vesicular. Esta zona es, según el estudio precedente (Maurer et al., 2009), la óptima, ya no sólo para la formación de vesículas estables de composición pura, sino también para las de composición mixta (en mezclas binarias de ácido graso con el correspondiente derivado monoacil-glicerol). Por ello es conveniente determinar de manera aproximada el valor experimental del pK_a aparente del LA, con objeto de corroborar si coincide dentro del rango común de pH en el que se obtienen agregados vesiculares y

puede considerarse como pH final de referencia en la preparación de los distintos tipos de vesículas.

El valor de pK_a aparente se ha estimado a partir de las curvas de titulación (Figura 6.2B). Estas curvas presentan un punto de inflexión (más notorio en la curva de LA/GML 1:0) que permite situar aproximadamente el pK_a aparente del LA cercano a pH 8.00⁵³. Este valor concuerda con los resultados de agregación. Se localiza en efecto dentro del estrecho margen de pH que es común para la formación de todos los tipos vesiculares estudiados. Por tanto, de ahora en adelante se toma por defecto como el pH final al que se preparan las distintas vesículas, tanto puras como mixtas, que contienen LA como ácido graso (los protocolos detallados figuran en la Caja 6.1).

6.2.2 Sensibilidad vesicular a la concentración: cálculo de la CVC

Una vez analizado el efecto de la composición sobre la capacidad de agregación vesicular a distintos valores de pH, se ha estudiado su influencia sobre la concentración mínima de lípido necesaria para la formación de vesículas o concentración crítica de agregación vesicular (CVC). Para ello, de nuevo se han considerado mezclas de LA/GML con diversas concentraciones relativas de GML, determinándose en cada caso la CVC mediante el ensayo con merocianina 540 (ver Material y Métodos).

El procedimiento ha sido el siguiente: Para cada mezcla de LA/GML se ha preparado una suspensión vesicular por dispersión de los compuestos anfifílicos en la proporción deseada (concentración total de 60 mM) en un tampón bicina 100 mM. Se ha seguido el método de vesiculación inducida por pH hasta fijar un pH final adecuado. A continuación, se han realizado diluciones seriadas de la muestra (en tampón bicina 100 mM a igual pH), analizándose por espectrofotometría el espectro de absorción en cada dilución tras añadir merocianina⁵⁴. La concentración total de lípido a la cual se detecta un cambio en la relación de absorbancias a 570 nm y 530 nm, indicativo de la aparición de fases hidrofóbicas, se identifica como la CVC de la mezcla. En la Figura 6.4 se ilustra como ejemplo los resultados obtenidos en tres experimentos independientes con diluciones seriadas de dispersiones de LA puro (es decir, LA/GML en relación molar 1:0).

A concentraciones relativamente altas de LA, la merocianina presenta un máximo de absorción alrededor de 560-570 nm, que es consistente con la presencia de ambientes hidrofóbicos en el seno de las bicapas vesiculares. Esto sucede por ejemplo para la dilución correspondiente a 14 mM (Figura 6.4A). Pero a medida que se diluye la muestra, disminuye este pico de absorción, y el máximo se obtiene en torno a 530-540 nm, lo cual es más propio de un ambiente hidrofílico. Aunque el cambio producido en el cociente Abs_{570}/Abs_{530} es inicialmente gradual, por debajo de un cierto valor de concentración próximo a 8 mM este cociente se vuelve ya aproximadamente fijo (Figura 6.4B). Aun así, las desviaciones de los datos no permiten precisar con detalle la

⁵³ En realidad, el comportamiento de las curvas de titulación en suspensiones como las de este estudio, que admiten la presencia de distintos tipos de fases o agregados en la muestra, es más complicado. De acuerdo con la regla de fases de Gibbs, a temperatura y presión constante deberían obtenerse varias mesetas o regiones de pH constante, coincidiendo con las distintas condiciones para las que coexisten dos tipos de agregados distintos en suspensión (Walde et al., 2006). No obstante, a la concentración de lípido a la que se ha trabajado, estas zonas apenas son perceptibles, por lo que el valor de pK_a aparente se ha estimado directamente a partir del único plateau apreciable.

⁵⁴ Concretamente, se toma 1 mL de la dilución y se le añaden 5 μ L de merocianina 1.1 mM, que es la cantidad que ha resultado más adecuada para obtener una línea base en el cociente Abs_{570}/Abs_{530} alrededor de 0.2. En todo caso se han barrido longitudes de onda comprendidas entre 450 nm y 620 nm.

localización del punto de inflexión. Se ha optado por analizar las tendencias de los experimentos independientes por separado y calcular la CVC en cada caso como la intersección entre las dos rectas de regresión lineal que mejor se ajustan a sus datos. Esto ya sí permite una estimación más adecuada de la CVC del LA: 7.95 ± 0.68 (media \pm desviación típica)⁵⁵.

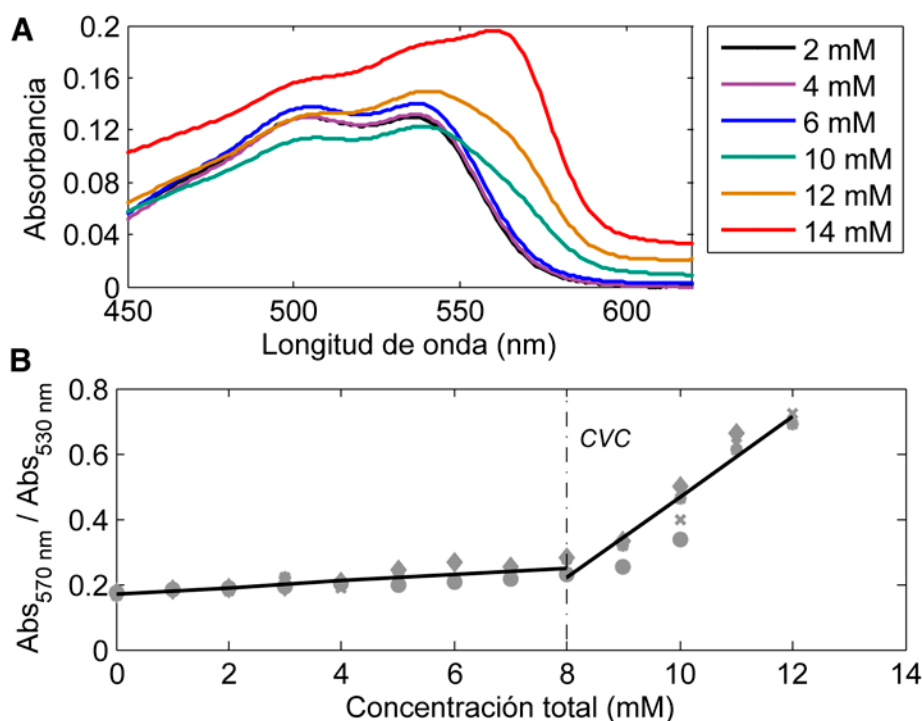


Figura 6.4 Cálculo de la CVC en dispersiones de LA en tampón bicina 100 mM a pH 8.00 y 40°C. (A) Espectro de absorción obtenido tras añadir merocianina en diversas muestras con distinta concentración de LA. (B) El cociente Abs₅₇₀/Abs₅₃₀ obtenido con las distintas diluciones se representa frente a la concentración de LA. En la figura se muestran las tendencias en tres experimentos independientes (puntos de distinto tipo). En cada caso se ofrece una estimación de la CVC: ésta se calcula como la intersección entre las dos rectas de regresión lineal que mejor se ajustan a los puntos correspondientes (líneas continuas), y corresponde con el valor de concentración a la cual se observa un cambio notorio en la tendencia de la curva (línea vertical punteada).

La estrategia seguida para calcular la CVC en el resto de mezclas ha sido semejante. De nuevo, para cada caso se han realizado varios experimentos independientes, presentándose la CVC como el promedio (media \pm desviación típica) de los valores de concentración crítica hallados con los distintos experimentos. La Tabla 6.1 resume los resultados obtenidos para los diversos ratios de LA/GML explorados. Se observa que la concentración total de compuestos anfifílicos que se requiere para formar vesículas disminuye fuertemente al añadir GML sobre dispersiones de LA: las dispersiones que cuentan con un ratio molar LA/GML 4:1 poseen una CVC que es del orden de veinte veces menor que la obtenida con LA puro. Este efecto continúa siendo patente al seguir incrementando la abundancia relativa de GML, aunque por desgracia las muestras correspondientes han sido preparadas a un pH más elevado, por lo que sus valores numéricos no

⁵⁵ En todo caso, con este modo de presentar la estimación, el propósito no es tanto ofrecer un valor numérico preciso de la CVC (tres experimentos independientes son obviamente insuficientes para presentar un estadístico descriptivo fiable), como ofrecer una idea del error cometido en el cálculo y por tanto del rango de valores de concentración donde podría situarse la CVC.

son comparables⁵⁶. En cualquier caso se corrobora el potente efecto estabilizador del GML. Las mezclas que contienen LA/GML en una relación molar 1:2, forman a pH 9.60 vesículas estables con tan sólo una concentración total de lípido de 0.07 mM (es decir, aproximadamente 0.02 mM de LA y 0.05 mM de GML); y aun es de esperar que su CVC fuera menor a un pH más próximo al pK_a del LA.

Tabla 6.1 Valores de CVC de distintos sistemas de composición mixta LA/GML a 40°C.

<i>Relación</i> <i>[LA]:[GML]</i>	<i>pH</i>	<i>CVC[LA+GML] (mM)</i>
1:0	8.00	7.95 ± 0.68
4:1	8.05	0.29 ± 0.04
2:1	8.10	0.17 ± 0.01
1:1	8.70	0.10 ± 0.02
1:2	9.60	0.07 ± 0.05

Por último, también se ha estudiado la CVC en mezclas de LA/DLPC con distintas proporciones relativas de DLPC. En ninguno de estos casos los experimentos independientes realizados han permitido resolver con suficiente precisión el valor de la CVC, ya que éste ha resultado ser, inesperadamente, muy bajo. Tan sólo las muestras más diluidas empleadas se sitúan en un rango de concentraciones próximo al punto de inflexión de la curva Abs570/Abs530 frente a concentración. Por eso en la Tabla 6.2 sólo se presentan valores de CVC aproximados. De todas formas, la tendencia es cualitativamente semejante a la obtenida con el GML: el enriquecimiento relativo en DLPC disminuye drásticamente la concentración mínima de lípido necesaria para la formación de vesículas. En definitiva, se postula que tanto la producción de derivados monoacilglicerol como de derivados fosfolipídicos de cadena corta pudo haber sido muy favorable para conferir mayor estabilidad a los compartimentos primitivos.

Tabla 6.2 Valores de CVC de distintos sistemas de composición mixta LA/DLPC a 40°C.

<i>Relación</i> <i>[LA]:[DLPC]</i>	<i>pH</i>	<i>CVC[LA+DLPC] (mM)</i>
1:0	8.00	7.95 ± 0.68
3:1	8.00	0.03
1:1	8.00	0.02
0:1	8.00	0.02

6.3 Influencia de la composición en la permeabilidad vesicular

El estudio experimental se ha completado con un análisis de la permeabilidad de membrana en los distintos tipos de sistemas vesiculares. Como ya se explicara, se pretende evaluar cómo de permeables pudieron ser las membranas primitivas a nutrientes, y contribuir a esclarecer cómo pudieron afectar los cambios de composición de membrana provocados por la adquisición de lípidos progresivamente más complejos a esta permeabilidad.

⁵⁶ Se ha demostrado que la CVC, al igual que la eficacia de agregación, varía con el pH (Morigaki et al., 2003). Otros factores de los que depende son el método de preparación, el tampón utilizado o la temperatura.

La permeabilidad se ha evaluado a través de ensayos de liberación del fluoróforo encapsulado carboxifluoresceína (CF) (estructura en Figura 6.1B). Aunque éste no es un compuesto de relevancia prebiótica, presenta la ventaja de producir una señal fluorescente fácil de medir. Al mismo tiempo es una molécula de tamaño intermedio: muy pequeña si se compara con el tamaño que podría tener un oligómero biológicamente relevante, pero probablemente algo mayor que los compuestos que actuaran de nutrientes prebióticos o precursores de aquellos oligómeros. En este sentido, puede servir presumiblemente como un adecuado punto de referencia que permita obtener una estimación a la baja de la velocidad de paso de nutrientes orgánicos disponibles en condiciones prebióticas a través de las membranas de los compartimentos primitivos⁵⁷.

6.3.1 Validación del procedimiento de encapsulación

Antes de realizar los ensayos de liberación, ha sido necesaria la validación y puesta a punto de la metodología experimental empleada para la encapsulación del soluto (Figura 6.5).

El procedimiento inicial de preparación de las suspensiones vesiculares ha sido equivalente al que se ha descrito para el resto de experimentos, salvo porque la dispersión de los compuestos anfífilicos se ha realizado sobre una solución de tampón bicina 100 mM a la cual se le ha añadido previamente el soluto a encapsular, la CF. Todos los tipos de mezclas lipídicas han demostrado formar rápidamente vesículas autoensambladas al prepararse a un pH próximo al pK_a del ácido graso. La Figura 6.5A muestra por ejemplo una micrografía de una dispersión de LA, donde se aprecia la formación de múltiples estructuras vesiculares de muy variados tamaños. No obstante, la obtención de vesículas de tamaño uniforme y la separación del soluto no encapsulado dentro de vesículas han resultado tareas más tediosas. Por eso, si bien la metodología general empleada se describe en Material y Métodos, en este apartado se presta especial atención en detallar algunos aspectos y condiciones específicas de la extrusión y la cromatografía que han resultado determinantes para un adecuado análisis de la liberación del soluto y cálculo de permeabilidad.

Para la extrusión de las vesículas, inicialmente se han utilizado filtros de polycarbonato con un diámetro de poro de 50 nm. Estos han resultado útiles para conseguir poblaciones de vesículas de OA/GMO de tamaño homogéneo, pero no han sido efectivos en las mezclas que contienen LA/GML (Figura 6.6). Los resultados de dispersión dinámica de luz indican que en estos casos enseguida, poco después de extrudir, la distribución de tamaños vesiculares se vuelve polidispersa (Figura 6.6, i.). Las vesículas adquieren variados tamaños. El efecto es todavía más notorio transcurrido un tiempo más largo (Figura 6.6, ii.), y en general se observa una clara tendencia de las vesículas a adoptar tamaños mayores de 50 nm. Esto sugiere ya no sólo que se tratan de estructuras muy dinámicas, que intercambian lípidos con facilidad, sino que difícilmente se amoldan a formas de reducido tamaño, previsiblemente porque son muy sensibles a la tensión derivada de una fuerte curvatura de membrana. Prefieren conformaciones de mayor tamaño, que están sujetas a menos tensión de curvatura, y que por tanto pueden ser estructuras más relajadas, en otras palabras, termodinámicamente más estables.

⁵⁷ Dado el tamaño de la CF (376 Da) y su carga negativa, se esperaría que la mayoría de nutrientes o precursores (al menos aquellos que pudieran ser necesarios para los primeros protometabolismos) difundieran más fácilmente que la CF a través de las membranas de compartimentos de la misma naturaleza. Aunque por supuesto, entrarían en juego muchos factores que harían que la permeabilidad pudiera cambiar mucho según el tipo de soluto y la composición de la membrana (ver Discusión).

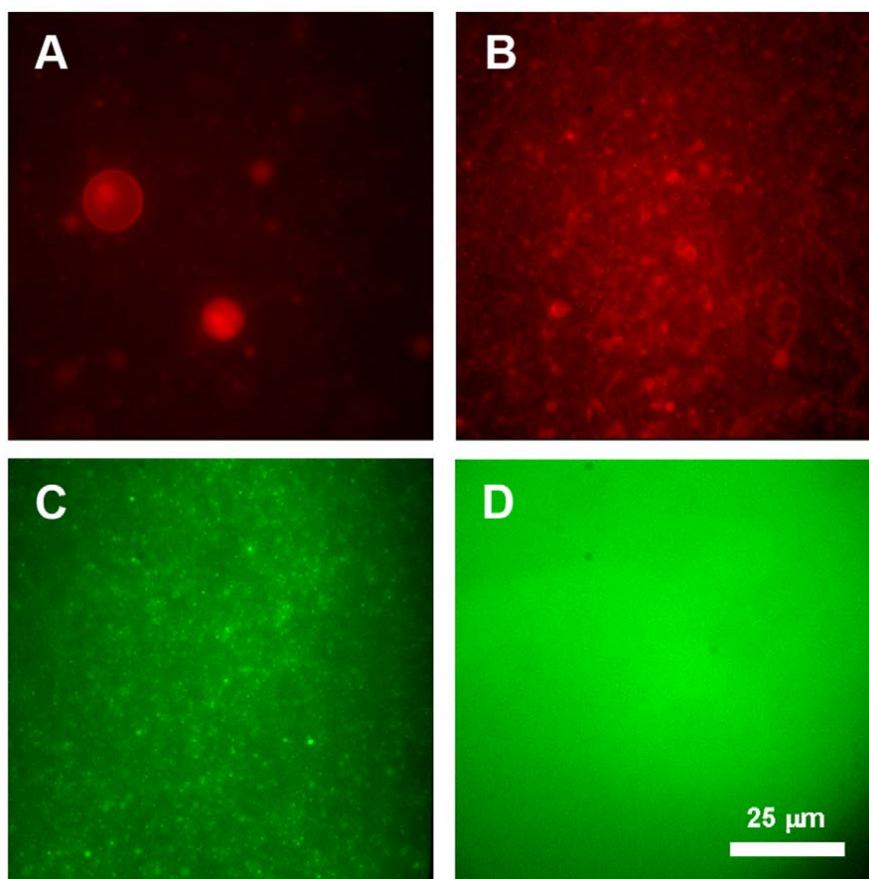


Figura 6.5 Validación por microscopía de fluorescencia de la metodología experimental usada para encapsular CF. (A) Micrografía de una solución acuosa de LA 21.5 mM en tampón bicina 100 mM conteniendo CF 8 mM, pH 8.00. Se observa la formación de estructuras vesiculares de diversos tamaños y grado de lamellaridad. (B) Aspecto de otra suspensión de vesículas de LA, pero 1h después de ser extruida a través de filtros de policarbonato con un diámetro de poro de 400 nm. (C) Vesículas de LA de tamaño homogéneo justo después de la cromatografía de exclusión molecular. Una vez retirado el fluoróforo no encapsulado, las vesículas que retienen CF exhiben un característico color verde. (D) La fluorescencia se extiende a toda la muestra tras añadir un detergente disruptivo como Triton-X100. Las muestras A y B están teñidas con el colorante lipofílico Rojo Nilo. La magnificación es la misma en todas las micrografías.

Con objeto de conseguir vesículas de LA/GML con una distribución de tamaños más uniforme, se ha escogido un tamaño de poro menos exigente, más favorable. Para ello se ha evaluado la distribución de tamaños vesiculares en una muestra no extruida, identificándose qué tamaños adquieren las vesículas de forma natural (Figura 6.6, iii.). Aunque la distribución es polidispersa, una alta proporción adoptan tamaños con un diámetro comprendido entre 300 y 800 nm. Así, se ha determinado utilizar para la extrusión filtros de policarbonato con poros de 400 nm de diámetro. Estos han demostrado dar mejores resultados⁵⁸ y no sólo se han empleado con las mezclas de LA/GML, sino también con las de LA/DLPC, entendiéndose que pudieran ser igualmente reticentes a adoptar formas vesiculares de muy reducido tamaño. En cambio, los poros de 50 nm se han utilizado únicamente para la extrusión en las mezclas de OA/GMO (y en las mezclas de LA/LOH, con las que sólo se ha realizado un estudio preliminar).

⁵⁸ Aun así, las vesículas tienden a diversificarse y adoptar distintos tamaños a medio plazo (Figura 6.6), uno de los motivos por los que la permeabilidad sólo se calculará a partir de los datos en los primeros minutos de liberación del encapsulado.

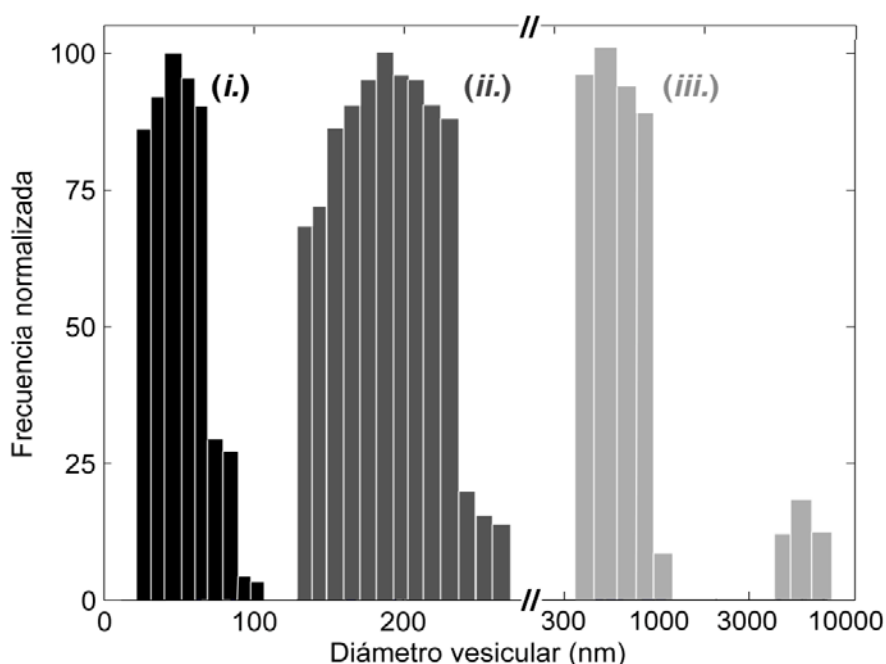


Figura 6.6 Distribuciones de tamaños vesiculares obtenidas en mezclas de LA/GML, según medidas de dispersión dinámica de luz a distintos tiempos. (i.) Una suspensión vesicular conteniendo LA/GML 1:1 (concentración total 3 mM) en un tampón bicina 100 mM ha sido analizada 30 min después de su extrusión a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm. (ii.) La misma muestra, analizada 12h después de la extrusión. (iii.) Perfil de tamaños vesiculares obtenido en una muestra sin extrudir de LA/GML 2:1 (concentración total 60 mM) en tampón bicina 100 mM.

A continuación, se ha puesto a punto la metodología para la separación del soluto no encapsulado mediante cromatografía de exclusión molecular. El volumen de agarosa de la columna se ha ajustado de modo que permita resolver adecuadamente la CF libre en solución y separarla de los agregados vesiculares que retienen el resto de CF. La eficacia de separación se ha evaluado mediante un seguimiento espectrofotométrico de cada una de las fracciones de elución resultantes. De acuerdo con su espectro de absorción (Figura 6.7A), la CF puede ser detectada controlando la absorbancia a 450 nm. En cambio, los agregados vesiculares, que presentan un típico espectro de dispersión (Figura 6.7B), se han analizado mediante la señal de absorbancia en una longitud de onda del espectro alejada de la franja en la que absorbe la CF, concretamente a 650 nm. La Figura 6.7C resume los resultados obtenidos tras pasar por la columna una muestra extruida de OA/GMO 2:1 en bicina 100 mM con CF 30 mM a pH 9.10. Se distinguen dos bandas de CF claramente separadas: aunque la mayoría del soluto eluye relativamente tarde de acuerdo con su reducido tamaño, una parte se adelanta y se obtiene con las fracciones 5, 6 y 7. Éstas corresponden con las fracciones donde eluyen los agregados vesiculares, tal como indica la señal de dispersión a 650 nm. Por tanto, los resultados sugieren no sólo que la separación de la CF es buena, sino que además el método de encapsulación es eficaz. La fracción 5 será la seleccionada para analizar la liberación de la CF retenida.

Puede sorprender la señal relativamente baja de absorbancia (turbidez) detectada en las fracciones que contienen vesículas (Figura 6.7C). No obstante, esto no significa que haya habido una pérdida o dilución masiva de los agregados a través de la columna. Más bien responde al hecho de que las vesículas han sido previamente extruidas a 50 nm, y el grado de dispersión de una muestra depende mucho del tamaño de los agregados en suspensión. Por otra parte, para la detección se ha escogido una longitud de onda bastante alta. El pico de dispersión habría sido

mayor si la presencia de agregados vesiculares se hubiera controlado a una longitud de onda por debajo del pico de absorción de la CF, por ejemplo a 350 nm.

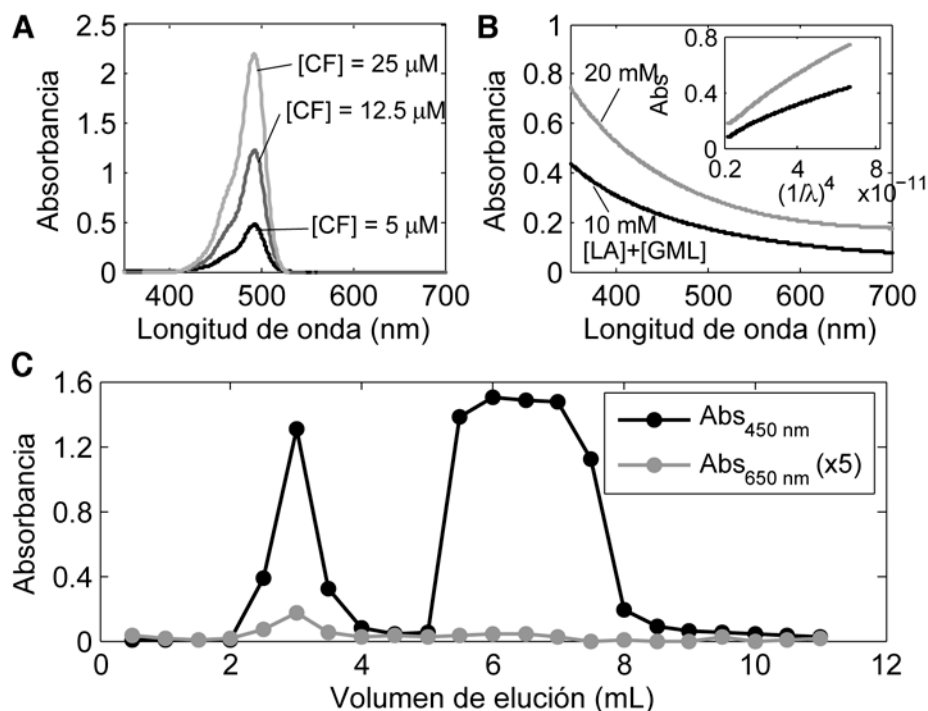


Figura 6.7 Separación de la CF no encapsulada por cromatografía de exclusión molecular. (A) Espectro de absorción en varias muestras patrón con distinta concentración de CF en bicina 100 mM a pH 8.00. (B) Espectro de absorción en dos muestras patrón de LA/GML 2:1 en bicina 100 mM a pH 8.00. El perfil obtenido se debe claramente a la dispersión producida por los agregados vesiculares en suspensión: la intensidad de luz dispersada escala con la inversa de la longitud de onda elevada a la cuarta potencia (inserto). (C) Control de la presencia de CF y de vesículas en las sucesivas fracciones de elución obtenidas tras pasar por la columna de cromatografía una muestra extruida de vesículas de OA/GMO 2:1 (OA/GMO a una concentración total de 60 mM, en una solución de bicina 100 mM con CF 30 mM a pH 9.10). La absorbancia a 450 nm se utiliza como indicador de la presencia de CF, mientras la señal de absorbancia a 650 nm sirve para controlar la presencia de agregados vesiculares.

En las mezclas que contienen LA, la dilución que se produce a través de la columna sí resulta problemática, ya que poseen una CVC relativamente alta. En estos casos, para evitar la ruptura de las vesículas durante la separación, el tampón utilizado para el equilibrado de la columna y la elución (un tampón bicina 100 mM a pH igual al de la muestra) se ha complementado con los compuestos anfífilicos a una concentración próxima a la CVC, es decir, próxima a la concentración de monómero disuelto que coexiste con las vesículas. Concretamente, contiene LA 6 mM cuando se trabaja con vesículas puras de LA; LA 0.20 mM y GML 0.05 mM con sistemas LA/GML 4:1; LA 0.10 mM y GML 0.05 mM con sistemas LA/GML 2:1; y LA 0.05 mM y GML 0.05 mM durante la separación en sistemas LA/GML 1:1. En el resto de mezclas la CVC es lo suficientemente baja como para que la dilución provocada durante la separación no tenga un efecto disruptivo, por lo que se ha obviado la adición de los compuestos anfífilicos al tampón.

Otro aspecto importante a considerar es la concentración total de lípido en la muestra inicial. Puesto que las distintas mezclas difieren en el valor de la CVC, es razonable que según el sistema en estudio se deba preparar los compuestos anfífilicos a una u otra concentración, con objeto de conseguir condiciones finales semejantes en cuanto al número de vesículas sobre las que

realizar los ensayos de liberación. Si se deseara analizar una cantidad aproximada de vesículas equivalente a 9 mM de lípido, debería disponerse inicialmente de 12 o 13 mM de una mezcla LA/GML 2:1, considerando la dilución a través de la columna, pero debería disponerse de más de 21 mM de LA si éste se prepara solo. En efecto, suponiendo una dilución aproximada de 1.25 a través de la columna (equilibrada con lípido), la muestra de LA quedaría posteriormente con una concentración aproximada de 17 mM, de la cual 8 mM correspondería con monómero disuelto, y sólo el restante (9 mM) aparecería formando vesículas. Un razonamiento semejante ha servido para fijar la concentración inicial de lípido en las demás mezclas.

En cuanto a la CF, también ha sido necesario controlar su concentración en la muestra inicial. Como se describe en Material y Métodos, la CF se autosilencia a altas concentraciones, y es útil explotar esta capacidad para discriminar la señal de fluorescencia debida al fluoróforo libre en el medio externo de la posible señal debida al fluoróforo encapsulado. Las dispersiones lipídicas se han realizado en tampón bicina 100 mM conteniendo CF 8 mM, con objeto de asegurar que el soluto retenido en las vesículas se encuentre totalmente silenciado y no emita señal fluorescente alguna (Figura 6.8). De esta manera, una vez retirada por cromatografía la CF libre en el medio, la liberación puede medirse fácilmente como el aumento de fluorescencia debido al aumento de la concentración de CF no encapsulada, que se presenta mucho más diluida y no llega a autosilenciarse. Una concentración inicial de 8 mM en el medio interno vesicular se ha estimado óptima para provocar un aumento apreciable de concentración externa de CF, y por tanto de fluorescencia, sin que se llegue a sobrepasar el límite a partir del cual comienza el autosilenciamiento. Considerando la dilución cromatográfica (como hemos dicho, ≈ 1.25) y suponiendo en el mejor de los casos un volumen de encapsulación del 1%, su liberación supondría una concentración final de equilibrio alrededor de 0.06 mM que, de acuerdo con la curva patrón de la Figura 6.8, se sitúa aún por debajo del límite de autosilenciamiento (situado en torno a 0.1 mM).

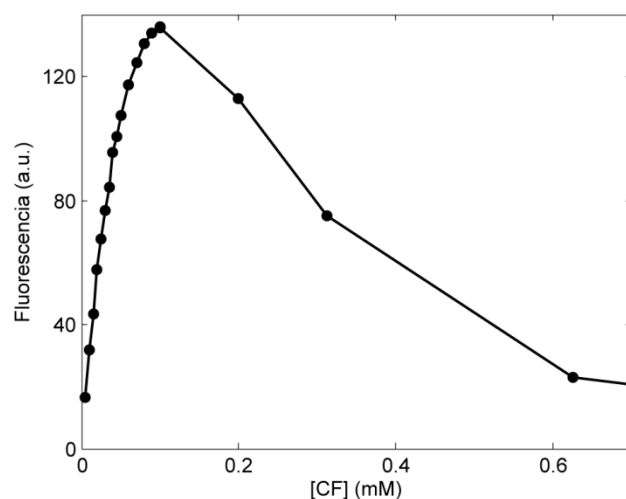


Figura 6.8 Curva patrón de calibrado de la señal fluorescente debida a la CF. Los puntos representan la intensidad de fluorescencia obtenida en distintas muestras de dilución de CF en tampón bicina 100 mM a pH 8.00. La región de concentración situada por debajo de 0.1 mM es aquella en la que la intensidad de fluorescencia es más sensible a cambios en la concentración de CF, y es en la que se ha procurado realizar los experimentos de liberación. La curva de regresión polinómica que mejor se ajusta a los valores experimentales de ese rango ($y = -15090 x^2 + 2788 x + 6$; $R^2 = 0.99$) se ha empleado para convertir en los ensayos de liberación las curvas de evolución de la fluorescencia en curvas de evolución de la concentración. Por encima de 0.1 mM la CF se autosilencia. Esta región es la idónea en la preparación del fluoróforo encapsulado, para evitar que interfiera con la señal fluorescente debida a la CF liberada.

Finalmente, otro factor decisivo ha sido la temperatura. Al igual que se controlara la temperatura durante la preparación de las vesículas mixtas que contienen LA, en la medida de lo posible se ha procurado mantener una temperatura relativamente elevada durante el proceso de extrusión y cromatografía para evitar la precipitación del LA. La extrusión se ha realizado sobre un *thermblock* a 40°C, y al calor de una lámpara. En cuanto a la columna de cromatografía, se ha situado cercana a la lámpara y esporádicamente se ha empleado un secador para garantizar que conservara una temperatura templada. Sólo con esta estrategia las vesículas de LA se han mantenido estables durante todo el proceso de separación y se ha conseguido una eficacia en la encapsulación óptima, como revela la presencia de numerosos puntos verdes en la muestra tras la cromatografía (Figura 6.5C). El mismo procedimiento se ha empleado también con el resto de mezclas para garantizar unas condiciones experimentales semejantes, confirmándose igualmente una eficaz encapsulación, que es el punto de partida indispensable para realizar los ensayos de liberación y calcular la permeabilidad.

6.3.2 Liberación del soluto encapsulado y cálculo de la permeabilidad

Ante la posibilidad de un proceso de equilibrado muy rápido, los ensayos de liberación del soluto encapsulado se han realizado inmediatamente después de recoger de la columna de cromatografía la primera fracción conteniendo vesículas, la fracción 5 de elución. Para cada composición lipídica se han realizado varios experimentos independientes de liberación, consistentes en medir (a 45°C) el soluto liberado a distintos tiempos en cada caso. La Figura 6.9A muestra las tendencias de liberación de CF obtenidas en los distintos sistemas experimentales analizados. Por conveniencia, las tendencias de la señal de fluorescencia se han traducido a unidades de concentración, utilizando para ello la curva patrón presentada en la Figura 6.8. Por otra parte, para mayor claridad, se presentan sólo los resultados de un único experimento representativo de cada tipo de membrana, si bien más adelante la permeabilidad se analizará en términos globales.

Las curvas experimentales obtenidas en la Figura 6.9A muestran aproximadamente la forma de un decaimiento exponencial, aunque la duración del proceso de equilibrado depende mucho del sistema en cuestión. Sucede muy rápido, alrededor de 1 hora, cuando se trata por ejemplo de mezclas LA/GML en un ratio molar 4:1. En cambio, en otras composiciones el equilibrio no se llega a alcanzar ni tan siquiera después de tiempos de espera relativamente largos (500 min). Por eso, una vez transcurrido un tiempo prudencial, se ha determinado en todo caso utilizar un detergente para solubilizar las vesículas y liberar el posible fluoróforo encapsulado restante (ver Figura 6.5D). Los valores resultantes se toman como el estado de referencia $[CF]_{eq}$, que corresponde con 1 (valor máximo normalizado) en el eje de ordenadas de la Figura 6.9A.

Una vez que se dispone de los valores de concentración normalizados, ya sí se pueden comparar las distintas tendencias entre sí. Claramente la permeabilidad del soluto es muy sensible a la composición lipídica de la membrana. Por ejemplo, una inspección visual rápida es suficiente para corroborar que el flujo salida de CF es mucho más rápido en vesículas de LA que en vesículas de OA/GMO, tal como cabe de esperar de un tipo de membrana más dinámico e inestable (Mansy et al., 2008; Maurer et al., 2009). Pero más interesante si cabe es el hecho de que no sólo la clase de lípidos que conforman la membrana es determinante sino también su abundancia relativa. Las vesículas de LA/GML se comportan muy distinto según el ratio molar al que se prepara la mezcla; y lo mismo sucede con las vesículas de LA/DLPC (Figura 6.9A). Pero más allá de estas consideraciones cualitativas generales, es conveniente realizar un análisis cuantitativo.

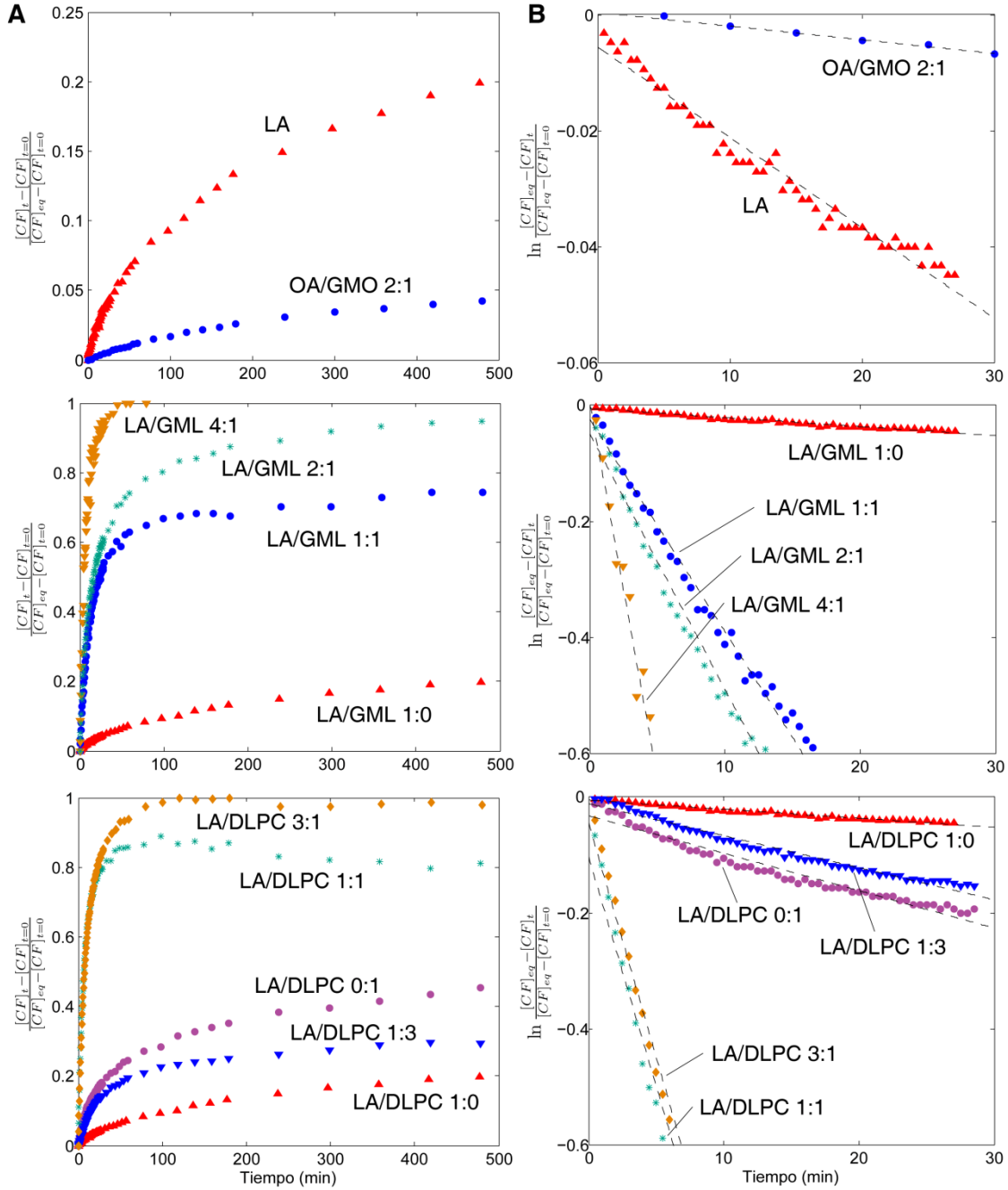


Figura 6.9 Perfiles de liberación de CF encapsulada en distintos sistemas experimentales a 45°C. (A) Evolución temporal de la concentración de CF liberada en cada sistema experimental. Para mayor claridad sólo se muestran los resultados de un único experimento para cada tipo de membrana. Los valores se presentan normalizados respecto a la concentración en el equilibrio, es decir tras la adición final de detergente. Las curvas exponenciales resultantes han sido linealizadas en una representación semilogarítmica para los primeros 30 minutos (B). De acuerdo con la Ecuación 11.4 de Material y Métodos, se obtienen tendencias aproximadamente lineales (R^2 en el rango 0.95 - 0.99), identificándose en cada caso la pendiente como la constante cinética k característica del proceso de liberación. Las condiciones experimentales de concentración y pH utilizadas así como los distintos valores de k calculados se resumen en la Tabla 6.3.

Con el propósito de calcular valores específicos de permeabilidad del soluto a través de los distintos tipos de membrana, los datos de liberación previos han sido transformados, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos, y representados en un gráfico semilogarítmico (Figura 6.9B). Si bien las tendencias a largo plazo resultan claramente no lineales, el estudio se ha

limitado a los primeros 30 min. Debemos ser conscientes de que dado el gran dinamismo que caracteriza a estas estructuras vesiculares, fenómenos tales como la agregación o la redistribución de tamaños sucederán a tiempos más largos y no harán sino enmascarar el verdadero efecto de la permeabilidad⁵⁹. Por tanto el análisis se centra sobre las permeabilidades iniciales. De acuerdo con los resultados de la figura, durante los primeros 30 min de liberación se obtienen tendencias aproximadamente lineales, pudiéndose tomar en cada caso la pendiente como el valor de la constante cinética de liberación k correspondiente, de acuerdo con la Ecuación 11.4 de Material y Métodos. Los valores de k obtenidos con cada tipo de membrana se describen en la Tabla 6.3, donde se presentan la mediana y los cuartiles de varios experimentos independientes.

A partir de las constantes cinéticas de liberación k pueden derivarse otros parámetros de permeabilidad relacionados. Concretamente, se han estimado los correspondientes coeficientes de permeabilidad P_x , considerando el supuesto de que las vesículas son unilamelares esféricas y presentan una distribución de tamaños monodispersa, con un radio r determinado por el tamaño de poro usado en la extrusión (ver Ecuación 11.5 de Material y Métodos). Así, $r_{LA} = r_{LA/GML} = r_{LA/DLPC} = 200$ nm, mientras que $r_{LA/LOH} = r_{OA/GMO} = 25$ nm. También se han determinado de manera aproximada los coeficientes de difusión molecular D_x (Ecuación 11.6 de Material y Métodos), tomando valores realistas para el grosor de membrana λ , a saber, $\lambda = 3$ nm en el caso de las bicapas formadas por los compuestos anfifílicos de 12 carbonos (Kucerka et al., 2005a), y $\lambda = 4$ nm en el de aquellas formadas por OA/GMO (Kucerka et al., 2005b). Tanto los valores de P_x como los de D_x aparecen recogidos también en la Tabla 6.3⁶⁰.

Tabla 6.3 Parámetros de permeabilidad calculados a partir de los ensayos de liberación de CF a 45°C.

Composición	Conc. total (mM)	pH	k ($\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)	P_x ($\times 10^{-10} \text{ cm/s}$)	D_x ($\times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
LA	21	8.00	3.14 (2.54;4.02)	2.09 (1.70;2.68)	3.78 (3.06;4.84)
LA/LOH 10:1	30	8.50	10.05 (9.28;10.83)	0.84 (0.77;0.90)	1.51 (1.40;1.63)
OA/GMO 2:1	30	9.10	0.39	0.03	0.08
LA/GML 1:0	21	8.00	3.14 (2.54;4.02)	2.09 (1.70;2.68)	3.78 (3.06;4.84)
LA/GML 4:1	17	8.00	134.00 (133.00;141.00)	89.33 (88.66;94.00)	161.39 (160.19;169.82)
LA/GML 2:1	12	8.00	127.00 (66.55;153.00)	84.67 (44.37;102.0)	152.96 (80.16;184.28)
LA/GML 1:1	12	8.00	52.75 (47.83;57.68)	35.17 (31.88;38.45)	63.53 (57.60;69.47)
LA/DLPC 1:0	21	8.00	3.14 (2.54;4.02)	2.09 (1.70;2.68)	3.78 (3.06;4.84)
LA/DLPC 3:1	10	8.00	75.70 (57.00;84.30)	50.47 (38.00;56.20)	91.18 (68.65;101.53)
LA/DLPC 1:1	7	8.00	31.60 (23.95;49.45)	21.07 (15.97;32.97)	38.06 (28.85;59.56)
LA/DLPC 1:3	6	8.00	7.07 (6.55;8.11)	4.71 (4.36;5.41)	8.52 (7.88;9.77)
LA/DLPC 0:1	3	8.00	10.80 (9.71;12.10)	7.20 (6.47;8.07)	13.01 (11.69;14.57)

* Valores presentados como mediana (cuartil 1; cuartil 3), excepto para OA/GMO, para el que sólo se ha realizado un único experimento.

⁵⁹ El objetivo no es dar con un modelo que proporcione una descripción precisa de la cinética del proceso completo, sino obtener una estimación de los valores iniciales de permeabilidad. En este sentido, el hecho de que las curvas de liberación no sigan una cinética de primer orden no es mayor impedimento, siempre que el modelo sencillo de permeabilidad considerado siga adecuándose razonablemente bien a las tendencias iniciales.

⁶⁰ Estos parámetros en realidad son de mayor utilidad que la constante cinética de liberación k . Mientras esta última es una constante fenomenológica con un valor relativo a factores intrínsecos al experimento, como son el tamaño y forma de las vesículas, P_x y D_x son independientes de esos factores: pueden ser extrapolados a otras condiciones y ser más fácilmente comparados con los valores de otros experimentos.

Los valores de permeabilidad hallados confirman que las vesículas de LA son bastante más permeables a la CF que las de OA/GMO y, a su vez, que las vesículas de composición mixta LA/GML y LA/DLPC son más permeables que las vesículas puras que sólo están formadas por LA. Esto último es interesante, ya que indica que las diferencias de permeabilidad no están claramente ligadas a las diferencias de estabilidad vesicular. Las mezclas de LA/GML, por ejemplo, resultan menos sensibles al pH y la concentración que las vesículas de LA, y en cambio son más permeables. Con todo ello, se plantea un escenario en el que las membranas primitivas, antes de adoptar lípidos estabilizantes de gran tamaño que supusieran una fuerte impermeabilización a nutrientes, pudieron explotar, al menos durante fases tempranas de su evolución, estadios intermedios de mezclas de ácidos grasos de cadena corta con ciertos derivados sencillos (de fácil síntesis) similares, que conferirían mayor estabilidad a las membranas al tiempo que facilitarían la difusión de nutrientes a su través. Por supuesto, la CF no es una molécula de relevancia prebiótica, y cabe cuestionarse cuál sería el comportamiento con otro tipo de solutos (ver Discusión).

Alternativamente, a partir de los resultados experimentales de liberación del soluto también puede calcularse la eficiencia de encapsulación a distintos tiempos, que ofrece una perspectiva adicional sobre las velocidades del proceso de difusión. Aunque no es posible determinar la evolución temporal de la concentración de CF dentro de las vesículas, el porcentaje de soluto encapsulado a distintos tiempos puede inferirse indirectamente a partir de las curvas de evolución temporal de su concentración en el medio externo, considerando que el valor inicial $[CF]_{t=0}$ corresponde con el máximo de encapsulación (100%) y la concentración final de equilibrio $[CF]_{eq}$ (tras añadir el detergente que solubilice las vesículas) con el mínimo (0%). De esta manera es evidente que toda diferencia que pueda existir entre $[CF]_{eq}$ y la concentración externa en un determinado momento $[CF]_t$ es debida a soluto encapsulado. Por tanto:

$$\% \text{ encapsulación} = \frac{[CF]_{eq} - [CF]_t}{[CF]_{eq} - [CF]_{t=0}} \times 100 \quad \text{Ec. 6.1}$$

La Figura 6.10 muestra el porcentaje de encapsulación obtenido a distintos tiempos con algunos de los tipos vesiculares analizados. De nuevo se constata que las vesículas de composición mixta, formadas por LA/GML o LA/DLPC, son mucho más permeables que el resto. El efecto no sólo es patente durante los 30 primeros minutos de liberación, como indican los valores de permeabilidad inicial, sino también a tiempos más largos (por ejemplo, tras 5h), a los que se observa una gran diferencia en la capacidad de encapsulación.

Por último, no debe tampoco escaparse que existen diferencias significativas en la permeabilidad a CF entre las membranas mixtas, según la abundancia relativa de los lípidos. Por ejemplo, el coeficiente de permeabilidad P_x obtenido con las mezclas de LA/DLPC es aproximadamente 5×10^{-9} cm/s cuando el ratio molar lipídico es 3:1, y en cambio 4×10^{-10} cm/s cuando el ratio es 1:3 (ver de nuevo Tabla 6.3). Por tanto, considerando la posible relevancia de las membranas de composición mixta como estadios intermedios en la evolución de los compartimentos biológicos, es conveniente un planteamiento más dinámico de la cuestión: ¿Cómo pudo cambiar la permeabilidad de las membranas a medida que éstas se enriquecieran progresivamente en lípidos más complejos de síntesis? Es decir, ¿qué patrón sigue la permeabilidad de las vesículas de composición binaria al ir modificando la abundancia relativa de GML ó DLPC en la mezcla con LA?

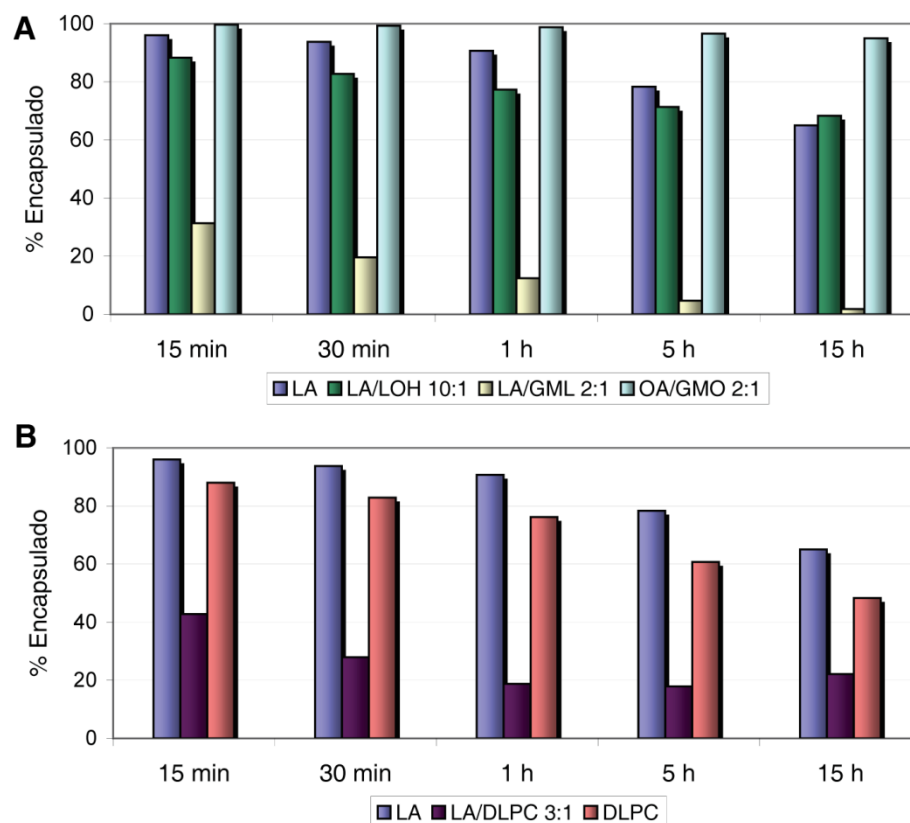


Figura 6.10 Eficacia de encapsulación de CF en diversos tipos vesiculares a 45°C. El porcentaje de soluto encapsulado a distintos tiempos se ha estimado indirectamente a partir de los resultados de las curvas de liberación, considerando como referencia los valores inicial y final de concentración externa de CF: el estado inicial se considera el de máxima encapsulación (100%) y el estado final (tras un tiempo suficientemente largo y tras añadir el detergente disruptivo) corresponde con el de mínima encapsulación (0%).

6.3.3 Permeabilidad dependiente de composición de membrana

Con objeto de comprender mejor cuál es el efecto del cambio de composición de membrana sobre la permeabilidad vesicular y dilucidar qué posibles mecanismos moleculares son responsables de las diferencias de permeabilidad, se han representado los valores de permeabilidad hallados con cada mezcla lipídica en función de su ratio o fracción molar de lípidos. La Figura 6.11 muestra las variaciones producidas en el coeficiente de difusión molecular como consecuencia de modificar la concentración relativa de GML ó DLPC en las mezclas de LA/GML y LA/DLPC (Figura 6.11A y Figura 6.11B, respectivamente). Se observa una semejanza considerable en el comportamiento en ambos tipos de sistemas. Sorprendentemente, la tendencia no es lineal, sino que se presenta un máximo de permeabilidad coincidiendo con situaciones en las que coexisten ambos lípidos, concretamente para las mezclas LA/GML 4:1 y LA/GML 2:1, y para LA/DLPC 3:1. Tras este máximo, la permeabilidad vesicular en mezclas más enriquecidas en GML ó DLPC vuelve a disminuir, hasta situarse en valores próximos a los de las vesículas puras de LA.

Por otro lado, las mezclas que muestran una mayor permeabilidad de membrana son también aquellas para las que se ha obtenido mayor dispersión en los valores del coeficiente de difusión molecular con los distintos experimentos independientes. El rango intercuartílico, representado en la Figura 6.11 con barras de error verticales, es especialmente alto en las mezclas LA/GML 2:1, LA/DLPC 3:1 y LA/DLPC 1:1. Esto en realidad podría ser un indicio de que se

tratan de regiones en las que la permeabilidad es especialmente sensible a pequeños cambios en las concentraciones relativas de los lípidos. De ser así, se explicaría que pequeños errores en las concentraciones a las que se preparan ambos lípidos se tradujeran en grandes diferencias de permeabilidad. Esta hipótesis sería consistente con la idea de un rango relativamente estrecho de fracciones molares lipídicas para las que se detecta el máximo de permeabilidad, es decir, con la existencia de un pico más o menos abrupto en lugar de una meseta en los perfiles de permeabilidad vs. concentración. No obstante, podrían concurrir otros motivos, como por ejemplo mayor disposición de estas mezclas a precipitar, a que las vesículas agreguen ante leves cambios en las condiciones del medio, etc.

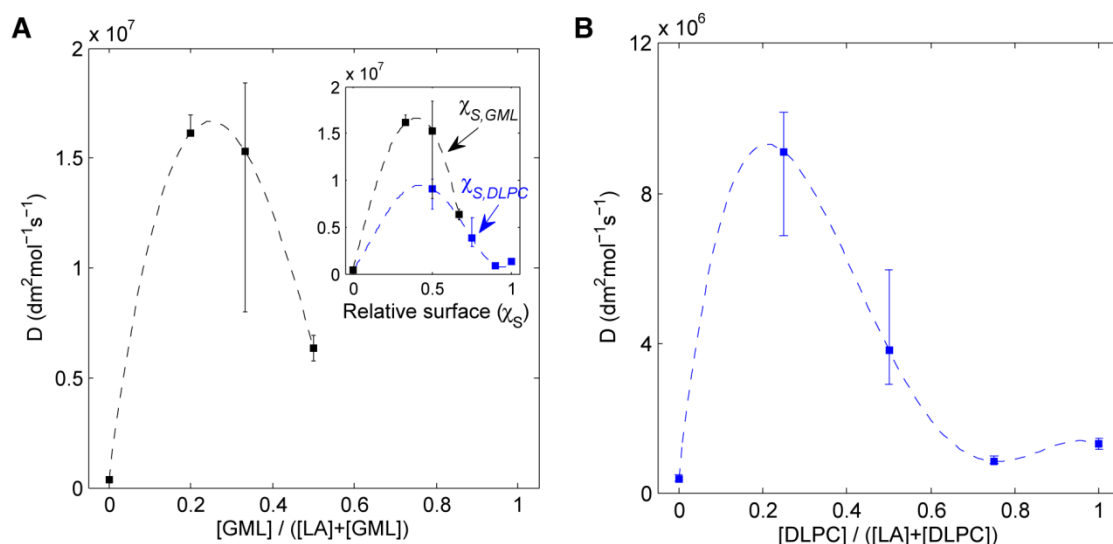


Figura 6.11 Permeabilidad de membrana en función de la concentración relativa de los lípidos en la mezcla. La mediana y el rango intercuartílico del coeficiente de difusión molecular D_x obtenido con cada ratio molar de LA/GML (A) y LA/DLPC (B) se representan con puntos y barras de error verticales, respectivamente. Las barras dan una idea de la dispersión de los valores hallados con los distintos experimentos independientes. En trazo discontinuo se muestran las curvas de regresión polinómica que mejor se ajustan a los valores experimentales de las medianas, es decir las curvas de dependencia de la permeabilidad con la composición. Alternativamente, los resultados de permeabilidad pueden presentarse en función de la superficie relativa de membrana χ_s ocupada por cada tipo de lípido (inserto). La contribución relativa de cada lípido a la superficie de membrana se estima directamente a partir de su concentración relativa, considerando el tamaño de la cabeza polar de ambas especies involucradas, LA y GML, ó LA y DLPC.

Aunque no es posible determinar el mecanismo molecular por el que aparece un máximo de permeabilidad a fracciones molares intermedias de lípidos, es muy probable que la explicación no esté relacionada con características moleculares específicas del lípido complejo sino más bien con propiedades más generales de las membranas de composición mixta. Ambos tipos de sistemas LA/GML y LA/DLPC exhiben comportamientos muy parecidos en cuanto a la respuesta de la permeabilidad al cambio de composición, a pesar de sus evidentes diferencias químicas, por lo que todo apunta a que responden a un mismo mecanismo causal, a un principio general común. En este sentido, un posible factor común determinante, que explicara la mayor permeabilidad en las mezclas intermedias, podría ser las irregularidades en la superficie de la membrana, como se tratará con más detalle en la Discusión (Mansy et al., 2008).

De momento, como medida sencilla preliminar para explorar la posible relevancia de las irregularidades en la superficie de membrana, se ha considerado la composición lipídica de las mezclas en términos de contribuciones relativas a la superficie de membrana en lugar de fracciones

molares o concentraciones relativas. El inserto a la Figura 6.11 muestra los resultados de permeabilidad en función de la superficie relativa de membrana que quedaría ocupada por lípido complejo (bien sea GML o DLPC) con cada ratio molar. La contribución relativa de cada tipo de lípido L a la superficie de membrana χ_S^L se ha estimado en cada caso a partir de su concentración relativa o fracción molar en la mezcla χ_{molar}^L , considerando el área de sección de la cabeza polar de ambas especies involucradas, α_L y α_1 , y suponiendo que las mismas proporciones molares relativas que guardan los lípidos en la preparación se conservan en las membranas vesiculares⁶¹. Así, se ha calculado del siguiente modo:

$$\chi_S^L = \frac{\chi_{molar}^L \alpha_L}{\chi_{molar}^L \alpha_L + (1 - \chi_{molar}^L) \alpha_1} \quad \text{Ec. 6.2}$$

De acuerdo con resultados experimentales de otros trabajos (Kucerka et al., 2005a; A. N. Albertsen, comunicación personal), se considera que $\alpha_{LA} = 0.2 \text{ nm}^2$, $\alpha_{GML} = 0.4 \text{ nm}^2$ y $\alpha_{DLPC} = 0.6 \text{ nm}^2$. Dados estos supuestos, se observa que el máximo de permeabilidad coincide en ambos sistemas experimentales aproximadamente con la situación de mayor heterogeneidad en la superficie de membrana, es decir con $\chi_S^L = 0.5$ (ver de nuevo inserto a Figura 6.11). Aunque esto no constituye una prueba de que el comportamiento esté determinado por las irregularidades en la superficie de membrana, sí es congruente con la posibilidad de que este u otro tipo de propiedad general semejante relacionada con el grado de heterogeneidad de membrana sea la causa responsable de cambios tan notorios de permeabilidad vesicular al variar la composición lipídica.

Los valores experimentales de permeabilidad obtenidos con los diversos ratios molares puntuales de lípido explorados son claramente escasos para precisar cuál es el perfil completo de dependencia de la permeabilidad con la concentración relativa de lípidos. No obstante, permiten trazar una primera función no lineal continua que sirva como estimación preliminar de la tendencia global de la permeabilidad vesicular a medida que varía la composición de membrana. En la Figura 6.11 se muestran, en trazo discontinuo, las curvas de regresión polinómica que mejor se ajustan a los valores de las medianas del coeficiente de difusión molecular con las distintas fracciones molares. En el sistema LA/GML (Figura 6.11A) se trata de una función cúbica del tipo $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$, donde $a = 1.967 \times 10^8$, $b = -3.605 \times 10^8$, $c = 1.43 \times 10^8$, $d = 3.776 \times 10^5$. En el sistema LA/DLPC (Figura 6.11B) consiste en una función polinómica de cuarto orden del tipo $y = ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e$, donde $a = -1.639 \times 10^8$, $b = 4.208 \times 10^8$, $c = -3.563 \times 10^8$, $d = 1.003 \times 10^8$, $e = 3.776 \times 10^5$. Nótese que estos valores numéricos son sólo válidos si se considera el coeficiente de difusión molecular D_x en unidades $\text{dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y si la abundancia relativa de lípidos se expresa en fracción molar del lípido complejo. Ambas funciones serán consideradas a partir de ahora como las curvas características de dependencia de la permeabilidad con la composición. Y más adelante se implementarán en las simulaciones para inferir el efecto del cambio de composición de membrana sobre la permeabilidad vesicular y obtener así dinámicas más adecuadas al comportamiento real de las vesículas.

⁶¹ Este supuesto es razonable dada la baja CVC que caracteriza a las mezclas. Aunque uno de los dos lípidos de la mezcla pudiera presentar mayor tendencia que el otro a incorporarse en la membrana, la concentración total de monómero disuelto es tan baja que se puede afirmar que la mayor parte de las moléculas de ambos tipos se encontrarán formando membranas vesiculares, y por tanto guardarán una proporción relativa (un ratio molar lipídico) equivalente en la muestra global y en la membrana.

Capítulo 7

7 Encapsulación del sistema protometabólico en un compartimento prebiótico: implicaciones cinéticas de la difusión limitada de nutrientes

Una vez que se han caracterizado experimentalmente las principales propiedades físicas de algunos tipos de vesículas modelo de membrana primitiva, se dispone de más elementos para poder abordar la cuestión de qué posibles consecuencias físico-químicas pudo acarrear la encapsulación temprana del metabolismo dentro de un compartimento. Como es lógico, este fenómeno debió involucrar tanto efectos sobre los procesos protometabólicos internos como efectos sobre el propio compartimento y su membrana, y es fundamental estudiar ambos para poder comprender el funcionamiento y las limitaciones a la estabilidad global del sistema.

En primer lugar, interesa explorar en qué medida las propiedades de un compartimento prebiótico realista, como una vesícula formada por el ensamblaje de compuestos anfifílicos sencillos, podrían imponer restricciones a la dinámica de una forma simple de metabolismo subyacente. Más concretamente, puesto que toda membrana cerrada (si es mínimamente estable) actúa como una cierta barrera a la libre difusión de solutos a su través, se plantea la siguiente pregunta: ¿qué posibles repercusiones cinéticas se derivan del hecho de una accesibilidad limitada de los nutrientes al medio interno de reacción? Para poder analizar este asunto, en este capítulo se contempla un escenario en el que el sistema protometabólico modelo, analizado en capítulos anteriores en condiciones de medio abierto (libre en solución), está encapsulado dentro de un compartimento. Se pretende estudiar en detalle la relación entre la permeabilidad de las moléculas precursoras a través de la membrana y el funcionamiento general de los procesos protometabólicos internos, con objeto de alcanzar una mejor comprensión de las condiciones de viabilidad del sistema compartimentado en una vesícula prebiótica realista. ¿Hasta qué punto la permeabilidad en un compartimento primitivo limitaría el desarrollo del protometabolismo en un régimen automantenido de concentraciones elevadas de intermediarios?

Como primera aproximación al problema que nos atañe, el compartimento tan sólo se considerará de manera implícita: se tratará como un contenedor de los procesos de reacción

química y una barrera difusiva que limite el flujo de entrada de precursores al sistema protometabólico. Sin embargo, no se tendrán en cuenta ni la estructura de la membrana, ni su morfología, ni su posible dinamismo. Estos atributos que añaden complejidad al modelo se reservarán para un estudio ulterior más completo.

7.1 Modelo cinético

En este capítulo se considera un esquema de reacciones idéntico al del sistema protometabólico modelo descrito en la Figura 3.1, con la diferencia de que éste se supone compartimentado. El modelo a estudiar ahora, representado en la Figura 7.1, consta de dos dominios bien diferenciados. Por una parte se distingue un *medio externo*, que actúa como un reservorio ilimitado de los precursores ricos en energía, S, T y U, donde se supone que la concentración de estas moléculas es constante, por ejemplo bajo una hipótesis de sopa primitiva en la que pueden ser suministradas por procesos químicos externos. Y por otra parte se distingue un *sistema*, que contiene la red de reacciones protometabólicas limitada o encapsulada por una membrana primitiva semipermeable. La membrana se considera permeable a los pequeños precursores, pero impermeable a los intermediarios metabólicos de la red interna de reacciones, que son más voluminosos⁶². De esta manera se permite la adquisición (por difusión pasiva) de los precursores disponibles en el medio externo, lo cual es un proceso necesario para garantizar el suministro al conjunto de reacciones internas, mientras que se previene la pérdida por liberación de los intermediarios.

Como ya se describiera anteriormente, el sistema de reacciones considerado está formado por tres ciclos catalíticos interconectados, capaces de producir sus propios catalizadores (STU, ST y SU) a partir de los precursores ricos en energía (S, T y U), tres reacciones accesorias de síntesis no catalizada de estos catalizadores, y por las reacciones irreversibles de degradación de los mismos. Esta red de reacciones presentaba en condiciones homogéneas (libre en solución) un interesante comportamiento dinámico: del análisis realizado en el Capítulo 5 se desprendía que era capaz de alcanzar un régimen estacionario de concentraciones relativamente altas de intermediarios, robusto para un amplio rango de velocidades de degradación. De alguna manera, la capacidad de automantenimiento resultaba de un compromiso entre velocidades de degradación modestas y una eficiencia suficientemente alta de las reacciones de condensación que involucran a los precursores. Sin embargo, así como las concentraciones de S, T y U entonces se suponían fijas, ahora serán variables, ya que el dominio de reacción está compartimentado. Por tanto, las restricciones de concentración constante se trasladan a la concentración de los precursores fuera, en el medio externo (S_{out} , T_{out} y U_{out}). Así, se puede estudiar de manera independiente (es decir, suponiendo el resto de parámetros como constantes) cuál es el impacto de la permeabilidad de membrana sobre la dinámica del sistema.

Se mantienen las mismas consideraciones respecto a la reversibilidad de las reacciones: las únicas reacciones irreversibles son las de degradación de los catalizadores. Al igual que antes, junto a cada proceso se muestran en el esquema las correspondientes constantes cinéticas. Las constantes cinéticas directas, señaladas como k_i , corresponden con el sentido de operación marcado

⁶² Este supuesto está en consonancia con numerosos modelos experimentales en los que se encapsulan oligómeros o polímeros (no necesariamente de relevancia prebiótica) dentro de vesículas lipídicas y se demuestra el progreso de ciertas reacciones o pequeñas rutas metabólicas en el interior del compartimento con el aporte externo de los correspondientes monómeros activos necesarios (Monnard y Deamer, 2002; Mansy et al., 2008; Ruiz-Mirazo et al., 2013).

por las flechas. En cambio, las constantes reversas, cuando es pertinente, se indican como k_{-i} (Figura 7.1). En el caso del paso de precursores a través de membrana, nos referiremos con frecuencia sólo al valor de la constante cinética de incorporación. Sin embargo, también se considera obviamente un proceso reversible: la misma constante cinética q_x se supone para la incorporación que para la liberación, en consistencia con un mecanismo de difusión pasiva (Ecuación 11.1 de Material y Métodos).

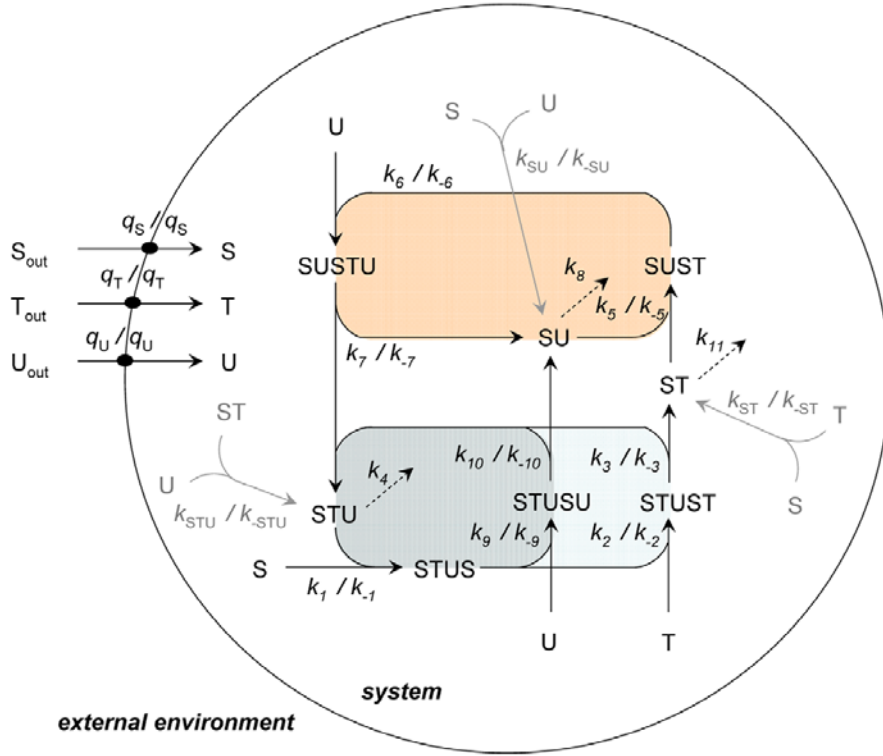


Figura 7.1 Modelo cinético de un posible protometabolismo compartimentado. Se distinguen dos dominios distintos: un ‘medio externo’, considerado como una fuente ilimitada de nutrientes, donde la concentración de los precursores ricos en energía S, T y U (designados como S_{out} , T_{out} y U_{out}) se supone constante; y un ‘sistema’ en el cual se desarrollan el conjunto de procesos protometabólicos, encapsulados por una membrana semipermeable (representada en forma de esfera) que permite la adquisición de los precursores del medio externo por difusión pasiva. Como red de reacciones interna se ha escogido el mismo sistema protometabólico modelo considerado en el Capítulo 5 (ver Figura 5.1). Las transformaciones correspondientes a los ciclos catalíticos de formación de catalizadores se muestran en negro y las reacciones accesorias de síntesis no catalizada en gris. Ahora la concentración de todas las especies moleculares dentro del sistema se considera variable (también la de S, T y U). A excepción de las reacciones de degradación de catalizadores (flechas discontinuas), todos los procesos son reversibles, incluida la difusión de los nutrientes S, T y U a través de la membrana: se supone que tanto su incorporación como su liberación vienen dadas por la misma constante cinética q_x .

Todas las constantes cinéticas se conservan invariables, con los valores fijos que mostraban en la Tabla 5.1, exceptuando las constantes cinéticas de degradación, k_4 , k_8 y k_{11} , que se hacen variar en el rango 0.0 – 0.6, y las constantes cinéticas de incorporación (y liberación) de precursores a través de membrana, q_s , q_T y q_U , que se hacen variar en el rango 10^{-3} – 10^{10} . Al igual que en los capítulos anteriores, tanto las constantes cinéticas como las concentraciones tomarán unidades consistentes. En este caso, aunque sólo se vaya a realizar un análisis determinista, las

concentraciones se expresan en mM, como se venía haciendo con los análisis estocásticos⁶³. Y el tiempo permanece expresado en unidades arbitrarias (τ), por argumentos similares a los que se daban en el Apartado 4.1, a saber, a falta de una noción clara de cuál podría ser la escala temporal más realista para el tipo de procesos prebióticos planteados. Precisamente, en la última sección de este capítulo se tratará la cuestión de cómo de larga debiera ser la unidad de tiempo, la escala temporal a la que sucedan las reacciones, en función de las restricciones físico-químicas que imponga el compartimento.

Por último, debe mencionarse que el esquema de reacciones de la Figura 7.1 omite cualquier referencia a la naturaleza de los productos de degradación de los catalizadores y a sus implicaciones para la dinámica protoceular. Una vez más, al tratarse de especies no reactivas que son fruto de procesos irreversibles, se supone que no afectan a la cinética de los intermediarios considerados en el modelo y pueden despreciarse. Sin embargo, esto no significa que no sean tenidas en cuenta en la termodinámica del modelo. Por supuesto, para garantizar un flujo continuo de materia y energía a través del sistema entero no sólo es necesaria una entrada (influjo) constante de precursores ricos en energía, sino la liberación de las formas energéticamente inactivas que resulten de la red interna de reacciones. Por tanto, se considera que esos productos inactivos de las degradaciones serían a su vez finalmente liberados al medio externo por difusión pasiva a través de la membrana. Sólo de esta manera se completa la coherencia termodinámica del modelo y se concibe que el sistema pueda operar en condiciones fuera del equilibrio⁶⁴.

7.2 Soluciones estacionarias y dependencia de velocidades de incorporación de precursores

La evolución temporal de las concentraciones de los diversos metabolitos en el interior acuoso del sistema (en el medio en el que todos ellos son variables) queda descrita por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

⁶³ En principio, las concentraciones podrían haberse mantenido en unidades arbitrarias, dado que el análisis determinista no precisa definir un volumen del sistema y asignarle un tamaño poblacional adecuado. Sin embargo, puesto que ahora los metabolitos estarán confinados dentro de un compartimento físico, que tendrá unas ciertas dimensiones limitadas, resulta más práctico asignar a sus concentraciones unidades que permitan asociar fácilmente el comportamiento del modelo con lo que podría ser razonable dentro de una vesícula lipídica.

⁶⁴ Por otra parte, si bien de momento el proceso de liberación de los productos de degradación sólo tiene implicaciones termodinámicas, será determinante para la dinámica y estabilidad global del sistema una vez se consideren otros aspectos distintos a la cinética de las reacciones, como la resistencia del compartimento a la tensión osmótica. Así, la acumulación transitoria de los productos “de desecho” pasará a ser un factor relevante en modelos más elaborados que contemplen por ejemplo la posibilidad de un choque osmótico (ver Capítulo siguiente).

$$\begin{aligned}
 \dot{[S]} &= \overline{v_S} - v_{ST} - v_{SU} - v_1 \\
 \dot{[T]} &= \overline{v_T} - v_{ST} - v_2 \\
 \dot{[U]} &= \overline{v_U} - v_{SU} - v_{STU} - v_6 - v_9 \\
 \dot{[STU]} &= v_{STU} + v_3 + v_7 + v_{10} - v_1 - v_4 \\
 \dot{[STUS]} &= v_1 - v_2 - v_9 \\
 \dot{[STUST]} &= v_2 - v_3 \\
 \dot{[ST]} &= v_{ST} + v_3 - v_{STU} - v_5 - v_{11} \\
 \dot{[SU]} &= v_{SU} + v_7 + v_{10} - v_5 - v_8 \\
 \dot{[SUST]} &= v_5 - v_6 \\
 \dot{[SUSTU]} &= v_6 - v_7 \\
 \dot{[STUSU]} &= v_9 - v_{10}
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 7.1}$$

Nótese que ahora el sistema incluye tres nuevas ecuaciones correspondientes a la concentración variable de S, T y U dentro del compartimento. Para mayor simplicidad, las ecuaciones están expresadas en función de las velocidades o flujos netos v de cada proceso en el sentido marcado por las flechas en el esquema de la Figura 7.1. El subíndice identifica el proceso y es consistente con la notación utilizada en la figura para las constantes cinéticas. Así, $\overline{v_S}$, $\overline{v_T}$ y $\overline{v_U}$ son las velocidades netas de entrada de los tres precursores S, T y U desde el reservorio externo. Cada una es el producto de una constante de flujo generalizada q_x y la diferencia entre la concentración externa e interna de la especie X ($[X_{out}] - [X]$) (ver expresión 11.1 de Material y Métodos):

$$\overline{v_S} = q_S([S_{out}] - [S]) \quad ; \quad \overline{v_T} = q_T([T_{out}] - [T]) \quad ; \quad \overline{v_U} = q_U([U_{out}] - [U]). \tag{Ec. 7.2}$$

El resto de velocidades son los flujos netos de reacción, que siguen planteándose según una cinética de acción de masas (ver Apartado 3.1). v_{ST} , v_{SU} y v_{STU} son las velocidades de formación espontánea no catalizada de los productos ST, SU y STU a partir de sus precursores, y las variables v_i (para $i = 1...11$) denotan las velocidades de los pasos catalíticos entre los distintos intermediarios.

Las soluciones de estado estacionario han sido nuevamente obtenidas por resolución numérica del sistema algebraico de ecuaciones que resulta de igualar a cero todas las ecuaciones diferenciales de las concentraciones. El número y tipo de estados estacionarios posibles se ha explorado en un amplio rango del espacio de parámetros. Como se muestra en la Figura 7.2 y se detalla en el texto a continuación, el comportamiento del sistema resulta ahora sensible tanto al valor de las constantes cinéticas de degradación, k_1 , k_8 y k_{11} , como al valor de las constantes cinéticas de incorporación de los precursores, q_S , q_T y q_U .⁶⁵

Los valores de las constantes cinéticas de degradación y los de las constantes cinéticas de incorporación constituyen dos fuentes de variabilidad distintas en el comportamiento del sistema. Dicho de otro modo, el modelo presenta dos grados de libertad⁶⁶. Por eso, para poder discernir el efecto de uno u otro tipo de parámetro, se ha seguido una estrategia de análisis en la cual

⁶⁵ Por convención, al igual que en los modelos previos, los efectos se muestran sobre la concentración del intermediario ST. No obstante, resultados cualitativamente semejantes se obtienen sobre las concentraciones de los demás metabolitos.

⁶⁶ Se presupone, para mayor simplicidad, que $k_1 = k_8 = k_{11}$, y $q_S = q_T = q_U$ en todos los casos analizados.

primeramente se han estudiado por separado las consecuencias de variar cada uno de ellos manteniendo el otro con valores constantes.

La situación más sencilla es aquella en la cual la difusión de los precursores no es limitante, es decir aquella en la que se supone una incorporación instantánea de los precursores desde el medio externo ($q_X \rightarrow \infty$). En tal caso, es obvio que las concentraciones internas de S, T y U se mantienen en todo momento constantes e iguales a las correspondientes concentraciones fijas del medio externo, es decir, $[S] = [S_{out}]$, $[T] = [T_{out}]$ y $[U] = [U_{out}]$. En consecuencia, el comportamiento de las soluciones estacionarias en el espacio de valores de las constantes cinéticas de degradación no es otro que el que se obtenía en el Apartado 5.2 con el modelo protometabólico libre en solución, con total disponibilidad de precursores (Figura 7.2A). La red de reacciones es capaz de mantenerse operativa en un estado estacionario de coexistencia de concentraciones internas relativamente altas de intermediarios siempre que $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$. Ahora bien, estamos ante un caso extremo ideal. Es natural que por muy permeable que pudiera llegar a ser la membrana del compartimento prebiótico, siempre supusiera una cierta restricción cinética al paso de nutrientes a su través, como se ha explicado al comienzo del capítulo. ¿Qué sucede por tanto con una difusión de precursores limitada?

De la misma manera que se procede a variar los valores de las constantes de degradación manteniendo un valor fijo de las constantes de incorporación, se ha procedido a la inversa, a estudiar los efectos de variar los valores de las constantes de incorporación de precursores, q_x , mientras se mantiene un valor fijo de las constantes de degradación de catalizadores. Las soluciones de estado estacionario se han explorado en un amplio rango de valores de q_x ($10^{-3} - 10^{10} \tau^{-1}$). La Figura 7.2B muestra los resultados obtenidos cuando $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$. Para valores relativamente altos de q_x el sistema es biestable, y muestra el mismo tipo de estados estacionarios que exhibía a iguales valores de los parámetros de degradación el sistema protometabólico no compartimentado (Apartado 5.2), o lo que es lo mismo, el sistema protometabólico compartimentado bajo el supuesto de difusión no limitante de nutrientes: se encuentran dos estados estacionarios estables, uno de concentraciones operativas (funcional) y otro residual, ambos separados por un estado estacionario inestable (un punto silla). En efecto, a medida que q_x aumenta (desplazándose hacia la derecha en la Figura 7.2B), las concentraciones de estado estacionario de ST se aproximan a los valores obtenidos en el análisis con difusión no limitante de precursores (es decir cuando $q_X \rightarrow \infty$) (Figura 7.2A). Sin embargo, el comportamiento es muy diferente a velocidades de incorporación menores.

Efectivamente, las concentraciones en el estado estacionario funcional (línea azul en la Figura 7.2B) decrecen progresivamente conforme se hacen disminuir los valores de las constantes de incorporación de precursores, hasta que se alcanza un punto crítico ($q_S = q_T = q_U = 10^{0.94} = 8.71 \tau^{-1}$) en el cual el estado estacionario funcional se fusiona con el estado estacionario inestable (línea verde). Por debajo de este punto el sistema se vuelve monoestable, y la única solución posible es un estado estacionario residual, con concentraciones de intermediarios próximas a cero (línea roja en la figura). Por lo tanto, para evitar el colapso en estas condiciones, el sistema debe mantener valores relativamente altos de q_x ; en otras palabras, la membrana ha de ser suficientemente permeable.

El análisis previo se ha extendido a otros valores de $k_4 = k_8 = k_{11}$, dentro del rango $0.0 - 0.6 \tau^{-1}$, con objeto de lograr un mejor entendimiento de la región general del espacio de parámetros que es compatible con el estado estacionario de automantenimiento (funcional). Los resultados se resumen en el diagrama de bifurcación tridimensional de la Figura 7.3. Si bien el sistema siempre finaliza en el estado estacionario residual cuando $k_4 = k_8 = k_{11} > 0.373 \tau^{-1}$, independientemente de

los valores de las constantes cinéticas de incorporación, el conjunto de parámetros q_x pasan a ser críticos cuando los valores de las constantes de degradación son menores.

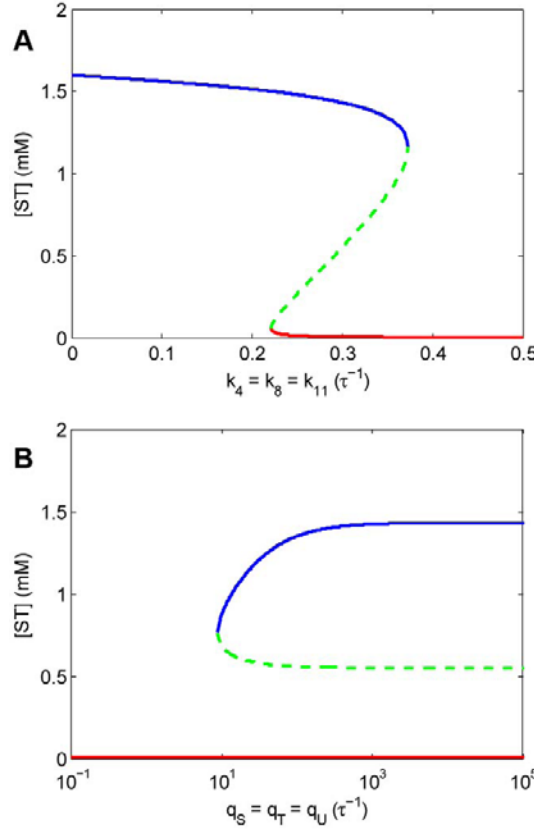


Figura 7.2 Diagramas de bifurcación bidimensionales. (A) Diagrama de bifurcación obtenido en función de los valores de las constantes cinéticas de degradación, suponiendo difusión instantánea de precursores ($q_x \rightarrow \infty$) – una situación equivalente a la del protometabolismo libre en solución, con total disponibilidad de precursores (Figura 5.2). (B) Diagrama de bifurcación con respecto a los valores de las constantes cinéticas de incorporación, considerando $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ }\tau^{-1}$. Nótese que a valores suficientemente altos de q_x , las concentraciones de estado estacionario se aproximan a aquellas obtenidas en (A) para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ }\tau^{-1}$. Tanto en (A) como en (B) se obtiene un punto de bifurcación que separa una región de monoestabilidad del estado estacionario residual de concentraciones mínimas (en rojo), de una región de biestabilidad en la que esta solución coexiste con un estado estacionario estable funcional de altas concentraciones (en azul), separado uno del otro por un estado estacionario inestable (en verde). Esto indica que tanto las constantes de degradación como las de incorporación son críticas para conseguir el automantenimiento.

En esencia, en el rango $0.221 \text{ }\tau^{-1} < k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \text{ }\tau^{-1}$ el sistema puede ser biestable (como se desprende por ejemplo de la Figura 7.2A), pero esto sólo sucede si los valores de q_x son relativamente altos. A medida que estos valores disminuyen, la difusión deja dar un suministro adecuado a los requerimientos metabólicos y se vuelve limitante: las concentraciones de intermediarios en el estado estacionario no nulo funcional comienzan a reducirse también (como queda reflejado en la Figura 7.3, en la curvatura de la superficie azul). Siguiendo esta tendencia, por debajo de un cierto valor crítico q_c , el sistema sufre una caída repentina al estado residual (borde de la superficie azul). Esta transición brusca sucede para $q_s = q_t = q_u = 10^{0.94} = 8.71 \text{ }\tau^{-1}$ cuando $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ }\tau^{-1}$ (Figura 7.2B; estrella en la Figura 7.3), pero se desplaza a valores más pequeños de q_x conforme las constantes cinéticas de degradación se hacen menores. Paralelamente, se obtiene una disminución de la concentración de ST a la cual ocurre esta transición, que se manifiesta en la caída progresiva de la intersección entre las superficies azul y

verde. Esta intersección finalmente se funde cuando $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.221 \tau^{-1}$ con el estado residual, para $q_S = q_T = q_U = 1 \tau^{-1}$.

Por debajo del límite $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.221 \tau^{-1}$ ya no existe una transición brusca del estado estacionario funcional al residual, sino un espacio continuo de concentraciones de estado estacionario admisibles de ST. El sistema muestra concentraciones altas a valores relativamente altos de q_x , y concentraciones progresivamente más bajas a valores más restrictivos de q_x . Sin embargo, a no ser que las condiciones estén muy próximas al equilibrio ($k_4 = k_8 = k_{11} = 0$)⁶⁷, el mayor descenso de las concentraciones aún se produce en un estrecho rango de valores de las constantes cinéticas de incorporación, localizado en general entre 0.1 y $10 \tau^{-1}$. Por ejemplo, para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.1 \tau^{-1}$ la concentración de estado estacionario de ST es 1.29 mM cuando $q_S = q_T = q_U = 10 \tau^{-1}$, pero cae a 0.13 mM cuando $q_S = q_T = q_U = 0.1 \tau^{-1}$. En definitiva, aunque el sistema mantiene concentraciones no nulas de intermediarios a valores bajos de permeabilidad, éstas se hacen tan pequeñas y próximas a las del estado estacionario residual que se vuelve discutible que el sistema sea funcional, *sensu stricto*, en condiciones tan alejadas del óptimo. Por lo tanto, si bien no existe estrictamente un valor crítico q_c en la región en la que $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$, los valores de las constantes cinéticas de incorporación todavía determinan que el sistema se desarrolle bien en un estado de concentraciones funcionales o en uno de concentraciones residuales.

En conclusión, ya no sólo las constantes cinéticas de degradación de los catalizadores (k_4 , k_8 y k_{11}), sino las constantes cinéticas de incorporación de las especies precursoras a través de membrana (q_S , q_T y q_U) son parámetros críticos en este modelo⁶⁸. Consecuentemente, para que el sistema protometabólico encapsulado o compartimentado pueda mantener un estado estacionario funcional, de concentraciones suficientemente altas de intermediarios, se necesita considerar una degradación de catalizadores relativamente limitada ($k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$) y además una permeabilidad del compartimento a los precursores relativamente alta (q_S , q_T y q_U al menos en el orden de magnitud de 0.1 a $10 \tau^{-1}$). Esto es lo que hasta aquí se desprende de un análisis exclusivamente teórico. ¿En qué medida se adecúa este postulado con las evidencias

⁶⁷ Para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0$ el sistema se comporta como un sistema cerrado (sin salidas de materia) que alcanza por tanto el equilibrio. Por ello, en zonas de los parámetros cercanas a esa condición la independencia de $[ST]^{ss}$ sobre q_x se debe únicamente al hecho de encontrarse en condiciones demasiado cercanas al equilibrio (muy alejadas por tanto de las condiciones funcionales).

⁶⁸ Puede argumentarse que realmente existe una única barrera crítica para la estabilidad del sistema, pero que se puede llegar a la criticidad de muy diversos modos, es decir variando diferentes parámetros. Hasta ahora, la manera de explorar la estabilidad metabólica en el espacio de parámetros había consistido en realizar diagramas de bifurcación (bidimensionales) en función del valor de las constantes cinéticas de degradación, y resultaba un valor crítico puntual de $k_4 = k_8 = k_{11}$. En la Figura 7.3 (tridimensional) se han incluido además los valores de las constantes cinéticas de incorporación, y se observa que se puede llegar al punto crítico bien aumentando las constantes de degradación, bien disminuyendo las constantes de incorporación o bien modificando ambos (la barrera crítica ahora se manifiesta a lo largo de toda una línea de intersección entre superficies). Del mismo modo, podría idearse un diagrama de cuatro dimensiones incluyendo un tercer tipo de parámetro influyente en el modelo, por ejemplo k_1 . No sería de extrañar que entonces hubiera nuevas maneras de llegar al punto crítico (desde luego, en el caso extremo en el que $k_1 = 0$, no hay posibilidad alguna de funcionamiento metabólico), y que probablemente se obtuviera no una línea sino una superficie crítica en el espacio de parámetros. Esto en cualquier caso no resta importancia al papel que juegan las constantes de degradación e incorporación como parámetros críticos; pero sí añade el matiz de que los valores numéricos concretos para los que se registre esta transición crítica serán relativos al valor del resto de los parámetros, supuestos fijos (el verdadero espacio de parámetros tendrá tantas dimensiones como constantes cinéticas diferentes). Por otra parte, si se han escogido estos parámetros y no otros es porque tienen un significado fisiológico más claro (son las estradas y salidas del sistema) y pueden además ser contrastados con valores experimentales reales.

experimentales que existen sobre la permeabilidad a pequeños solutos en modelos de membranas primitivas?

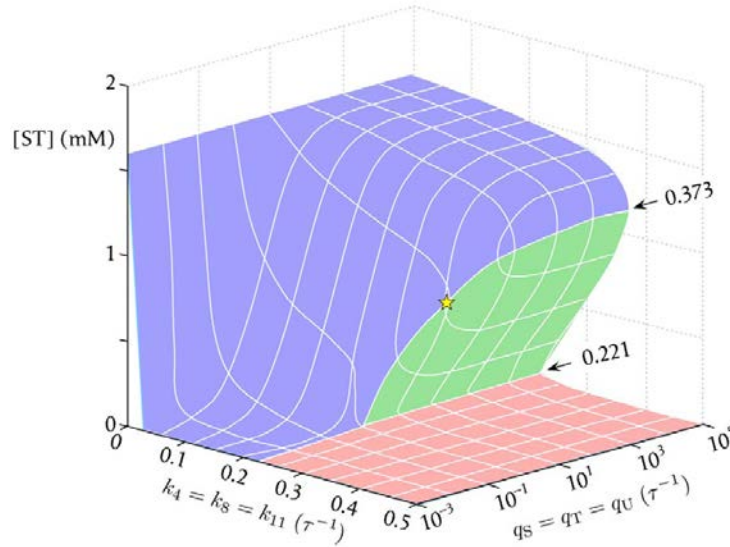


Figura 7.3 Diagrama de bifurcación tridimensional. Se muestra la dependencia de las soluciones estacionarias tanto con el valor de las constantes cinéticas de degradación catalizadores (k_4 , k_8 y k_{11}) como con el valor de las de incorporación de precursores (q_s , q_T y q_U). Tres regiones se distinguen: (i) Para $k_4 = k_8 = k_{11} > 0.373 \tau^{-1}$, sólo es posible la solución residual (superficie roja) independientemente de los valores de q_s , q_T y q_U . (ii) En el rango $0.221 \tau^{-1} < k_4 = k_8 = k_{11} < 0.373 \tau^{-1}$ es posible el mantenimiento en una solución funcional (superficie azul), siempre que no se traspase un punto crítico de q_s , q_T y q_U (señalado con una estrella para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$) para el que dicha solución queda absorbida por la solución inestable (superficie verde). (iii) Para $k_4 = k_8 = k_{11} < 0.221 \tau^{-1}$, sólo existe una solución estacionaria posible, pero $[ST]^{ss}$ sigue dependiendo fuertemente del valor de las constantes de incorporación, que se mantienen cruciales para relacionar esta solución bien con un estado estacionario propiamente funcional o más bien con un funcionamiento residual difícilmente operativo.

7.3 Restricciones a la permeabilidad: implicaciones sobre la escala temporal de los procesos protometabólicos internos

Hasta ahora, se ha considerado que todos los procesos definidos en el modelo protometabólico sucedían en una escala de tiempo arbitraria. Esto en principio permite asignar libremente unidades de tiempo, siempre y cuando las unidades sean consistentes entre los distintos procesos que tienen lugar en el sistema. Sin embargo, en la práctica, en la medida en la que se disponga de información sobre la naturaleza de las moléculas involucradas, será razonable suponer ciertas restricciones sobre la escala temporal general de los procesos. Basta señalar, por ejemplo, que los catalizadores eficientes (tales como enzimas proteicas) estarían seguramente ausentes en las etapas tempranas de la emergencia de la vida, por lo que las velocidades de interconversión serían probablemente mucho más lentas en condiciones prebióticas; en esencia, deberían considerarse escalas de tiempo más largas que aquellas características de los procesos bioquímicos actuales. Este tipo de razonamiento ya ha sido expuesto anteriormente (Apartado 4.1).

Sin embargo, al margen de consideraciones cinéticas obvias como la eficiencia catalítica (aún es más, inclusive *antes* si quiera de tener en cuenta cómo el desarrollo progresivo de los catalizadores pudiera acelerar el curso general de las reacciones protometabólicas), los valores de permeabilidad en sistemas compartimentados, como el que aquí se trata, implicarían ya

importantes restricciones sobre la escala temporal de los procesos químicos encapsulados⁶⁹. En el punto anterior se ha demostrado que la capacidad de mantenimiento del sistema en un estado estacionario funcional se ve amenazada a valores relativamente bajos de las constantes cinéticas de incorporación (q_s , q_T y q_U). Por ello, presumiblemente, la escala temporal de las reacciones protometabólicas internas no debería ser demasiado corta (es decir, no resultaría adecuado que las reacciones operaran demasiado rápido). De otra forma la adquisición de las moléculas precursoras desde el medio externo no sería suficiente para dar soporte a la demanda interna⁷⁰. Por ejemplo, para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ (con un valor crítico $q_c = 8.71 \text{ } \tau^{-1}$), una escala temporal general de segundos requeriría valores de constantes cinéticas de incorporación por encima de 8.71 s^{-1} , mientras que valores por encima de 8.71 h^{-1} ($\sim 0.002 \text{ s}^{-1}$) serían suficientes si las reacciones sucedieran en una escala temporal general de horas⁷¹. Surge por tanto la pregunta de cuál sería la escala de tiempo general mínima compatible con el funcionamiento de este protometabolismo dentro de un compartimento prebiótico realista.

En el Capítulo 6 se analizó experimentalmente la permeabilidad de membrana en diversos tipos de sistemas vesiculares considerados como modelo de compartimento primitivo, a través de ensayos de liberación del soluto CF. Como ya se explicó en su momento (en el inicio del Apartado 6.3), éste no es un compuesto de relevancia prebiótica, pero puede servir, dado su tamaño y su carga, como un adecuado punto de referencia para estimar la velocidad de paso de posibles precursores o nutrientes orgánicos sencillos a través de membranas de igual composición. Por tanto, aun siendo conscientes de lo tremendamente simplificador que resulta, supondremos que los resultados experimentales obtenidos con la CF ofrecen una estimación de la permeabilidad de nutrientes orgánicos disponibles en condiciones prebióticas a través de membranas primitivas. De acuerdo con estas premisas, los valores de q_s , q_T y q_U en el modelo protometabólico pueden ser sustituidos por alguno de los valores que entonces se determinarían del parámetro k (Tabla 6.3)⁷².

En primer lugar, se ha estudiado las implicaciones de la encapsulación del sistema protometabólico dentro de un compartimento con propiedades de permeabilidad semejantes a aquellas de las vesículas de LA, como caso más primitivo posible. De este modo, se ha supuesto

⁶⁹ A lo largo de este trabajo se defiende que la compartimentación es un fenómeno que debió ocurrir desde etapas muy tempranas de la evolución prebiótica, antes de que comenzaran a desarrollarse metabolismos de cierta complejidad.

⁷⁰ Este problema ya ha sido previamente planteado de manera teórica por Szathmáry (2007), y distinguido bajo el término “*autosofoco*”. Sin embargo, todavía requiere un estudio más detallado, basándose en ejemplos concretos como el sistema de la Figura 7.1.

⁷¹ En este tipo de razonamientos se considera que todos los procesos internos conservan los valores numéricos de sus constantes cinéticas de acuerdo con las cantidades fijadas en la Tabla 5.1 (es decir, los ratios siempre se mantienen entre ellos, para asegurar las mismas “reglas” y la validez de los diagramas de bifurcación), y se exploran las consecuencias de variar las unidades de tiempo en que se expresan todas las constantes de reacción. Esto no sólo se aplica a las reacciones de interconversión sino lógicamente también a los procesos de degradación.

⁷² Tal como se explica en Material y Métodos y se demuestra en el Apéndice II, la constante fenomenológica k del proceso difusivo toma (bajo supuestos muy razonables – ver Apéndice II) un valor equivalente al de la constante cinética de flujo q_x , de modo que en la práctica puede identificarse con ésta. En el caso de los experimentos de permeabilidad a CF, al tratarse de un eflujo, se refiere a q_x como la constante cinética de liberación. Sin embargo, como ya se ha explicado al comienzo del capítulo (y queda patente en la Ecuación 11.1 de Material y Métodos), la misma constante cinética q_x se aplicaría al proceso contrario de influjo o entrada de CF al medio intravesicular. En definitiva, k se relaciona indistintamente con el valor de la constante cinética de liberación y el de incorporación. Por tanto, puede trasladarse directamente al valor de las constantes q_s , q_T y q_U .

que $q_S = q_T = q_U = 3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (ver de nuevo Tabla 6.3).⁷³ Ahora sí se puede estimar la restricción que ejerce el compartimento (su permeabilidad) sobre la escala temporal de la red protometabólica interna, comparando q_S , q_T y q_U con q_c . Por ejemplo, tomando de nuevo la condición en la que $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$, se puede demostrar fácilmente que ni una escala temporal de segundos ni una escala temporal de horas serían lo suficientemente largas para permitir el mantenimiento del sistema con concentraciones relativamente altas de intermediarios, ya que $q_S = q_T = q_U < q_c$ con ambas unidades. En efecto, $3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} < 8.71 \text{ s}^{-1}$, y $3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} < 0.002 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. En tales circunstancias, la escala de tiempo general para las reacciones protometabólicas debería ser más larga (procesos más lentos); debería abarcar al menos $8.71 / (3.14 \times 10^{-5})$ segundos, es decir $2.77 \times 10^5 \text{ s}$. Como se muestra en la Tabla 7.1, esto se cumple en primer lugar para una escala de tiempo de semanas (1 semana = $6.05 \times 10^5 \text{ s}$). Entonces $q_c = 8.71 \text{ semana}^{-1} = 1.44 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, y como resultado $q_S = q_T = q_U > q_c$. Esto implicaría la restricción en el modelo de que las constantes cinéticas de primer orden, tales como k_7 , deberían tomar al menos unidades del orden de semana^{-1} , y las constantes cinéticas de segundo orden, tales como k_1 , unidades de $\text{mM}^{-1} \text{ semana}^{-1}$.

Tabla 7.1 Escalas de tiempo compatibles con el automantenimiento del protometabolismo compartimentado.

Escala temporal	$q_c \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Vesículas de LA	Vesículas de LA/GML 2:1	Vesículas de OA/GMO 2:1
Segundo	8.71	–	–	–
Minuto	1.45×10^{-1}	–	–	–
Hora	2.42×10^{-3}	–	–	–
Día	1.01×10^{-4}	–	+	–
Semana	1.44×10^{-5}	+	+	–
Mes	3.36×10^{-6}	+	+	+

⁺ Escalas temporales que permitirían, en condiciones realistas de compartimentación, el mantenimiento de un protometabolismo funcional dentro de los tipos vesiculares indicados, suponiendo la región de los parámetros dada por $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ y precursores cuyas propiedades de permeabilidad fueran semejante a las de la CF.

El efecto crítico que tiene la escala temporal de los procesos protometabólicos sobre el automantenimiento de concentraciones relativamente altas de sus intermediarios se ha comprobado por integración numérica. La Figura 7.4 ilustra la evolución temporal de la concentración de ST para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ y $q_S = q_T = q_U = 3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (es decir, suponiendo precursores tipo CF a través de vesículas de LA) para varios casos de sistemas compartimentados que difieren en la escala temporal de sus reacciones internas (incluidas las de degradación). En todos ellos la condición inicial corresponde con aquellas concentraciones halladas para el estado estacionario funcional con difusión no limitante de precursores ($q_X \rightarrow \infty$). Se demuestra que en estas condiciones, sólo el sistema con un protometabolismo más lento, con reacciones operando en una escala temporal de semanas, prospera y se mantiene en un estado estacionario con valores de intermediarios funcionales.

⁷³ Los valores difieren ligeramente de los presentados en el artículo (Piedrafita et al., 2012b), sencillamente porque allí el valor de k se calculó a partir de un único experimento, mientras que aquí es la mediana de varios experimentos (ver de nuevo Tabla 6.3).

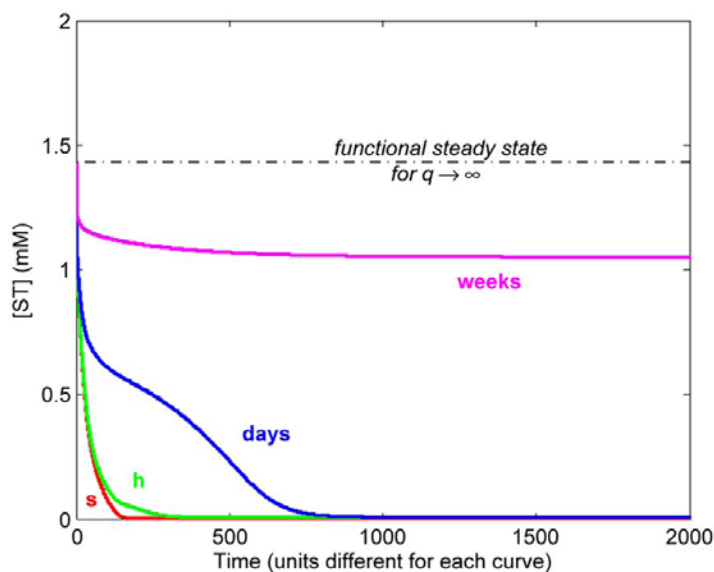


Figura 7.4 Evolución temporal de la concentración de ST en protometabolismos encapsulados operando a distinta velocidad. Los distintos experimentos difieren entre sí tan sólo en la escala temporal general de los procesos internos de reacción (tanto reacciones de interconversión como de degradación). Los valores de las constantes cinéticas son los mismos en unos casos y en otros, pero se expresan en unidades de tiempo diferentes, consistentes en cada caso con la escala temporal respectiva (por ejemplo, para una escala temporal de semanas todas las constantes cinéticas de primer orden toman unidades semana⁻¹ y todas las de segundo orden unidades mM⁻¹ semana⁻¹). En cambio, la velocidad de incorporación de nutrientes es fija en todos los experimentos, pues responde a las propiedades de permeabilidad de la membrana: se considera que $q_s = q_r = q_v = 3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Las unidades en el eje de abscisas permanecen indefinidas ya que son determinadas por cada escala de tiempo particular considerada. En todos los casos $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$.

El procedimiento seguido para especificar (o más bien delimitar) las escalas de tiempo posibles para los procesos protometabólicos es extensible a otros valores de las constantes de degradación $k_1 = k_8 = k_{11}$. En términos generales, puesto que los valores mínimos de las constantes de difusión a través de membrana necesarios para preservar un estado estacionario funcional del sistema se localizan en un estrecho rango (típicamente entre 0.1 y $10 \text{ } \tau^{-1}$), no cambia de manera significativa la escala de tiempo crítica hallada de una situación a otra. De hecho, incluso en una hipotética situación extrema favorable en la que $q_c = 0.1 \text{ } \tau^{-1}$, todavía se requeriría una escala temporal mínima de horas, considerando las propiedades de permeabilidad de las vesículas de LA.

¿Qué sucede al considerar la compartimentación del protometabolismo en otros tipos vesiculares más evolucionados? ¿Puede predecirse algún tipo de tendencia o cambio en la escala temporal mínima de los procesos internos durante las primeras fases de transformación de la membrana? Se han estudiado las implicaciones de la encapsulación en otros dos sistemas de referencia: vesículas compuestas de LA/GML (en relación molar 2:1), como posible modelo representativo de un estadio temprano de evolución de la membrana, y vesículas de OA/GMO (en relación molar 2:1), que al estar integradas por lípidos de mayor longitud se consideran todavía más evolucionadas. Aplicando razonamientos similares a los empleados anteriormente con las vesículas de LA, se deduce que la situación se volvería menos restrictiva (en el sentido de que se admitirían escalas de tiempo menores, es decir, procesos más rápidos) con compartimentos mixtos de LA/GML 2:1 que con aquellos formados sólo por LA, puesto que serían más permeables a precursores ($q_s = q_r = q_v = 1.27 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (recordar valores de k en Tabla 6.3). En cambio, una hipotética transición posterior de la membrana hacia composiciones binarias de OA/GMO, que se demuestran bastante más impermeables ($q_s = q_r = q_v = 3.90 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), conllevaría una fuerte restricción sobre la escala temporal de los procesos internos. Nótese en la Tabla 7.1 que las

reacciones quedarían limitadas para $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ a escalas de meses con este tipo de compartimento. Esto constituye *a priori* una importante limitación para el desarrollo de metabolismos más eficientes en el interior de compartimentos lipídicos, por lo que se tratará más detenidamente en la Discusión desde un punto de vista evolutivo.

Por último, no debe olvidarse que todos los cálculos de escalas temporales se han realizado infiriendo la permeabilidad a precursores a partir de los valores experimentales con CF, y que por tanto quizá se subestime la velocidad crítica a la que realmente estarían sujetas las reacciones con nutrientes disponibles en condiciones prebióticas, que previsiblemente cruzarían la membrana más fácilmente que la CF. En otras palabras, escalas de tiempo algo más cortas (es decir, velocidades metabólicas algo más rápidas) que las que se exponen en la Tabla 7.1 estarían probablemente todavía permitidas. Por otra parte, las implicaciones, en la medida en la que se refieren a limitaciones en la escala temporal para el automantenimiento de un protometabolismo funcional, permanecerán circunscritas al modelo particular estudiado y a la región del espacio de parámetros explorada. De todas formas, la necesidad de una adecuada relación entre la velocidad de incorporación de precursores y la actividad metabólica se presenta como un aspecto fundamental a tener en cuenta, y el caso particular aquí analizado constituye un primer ejemplo concreto con el que estimar las restricciones a las que podría exponerse un protometabolismo compartimentado.

Capítulo 8

8 Encapsulación del sistema protometabólico en un compartimento prebiótico: dinámica protocelular

En el capítulo anterior se ha realizado una primera aproximación al estudio del sistema protometabólico modelo compartimentado en una vesícula prebiótica. El análisis se ha centrado concretamente sobre las restricciones cinéticas generadas en los procesos de reacción como consecuencia de una accesibilidad limitada de nutrientes al medio intravesicular. Sin embargo, como ya se ha señalado, el compartimento se ha considerado tan sólo de manera implícita, sin tener en cuenta el comportamiento dinámico de la membrana vesicular. Más allá de las repercusiones sobre los procesos protometabólicos (en términos de restricciones derivadas de cambios en la permeabilidad o accesibilidad a nutrientes), todavía no se ha estudiado en qué medida afecta el propio dinamismo del compartimento (promovido por el continuo ensamblaje y desensamblaje de moléculas lipídicas en la estructura supramolecular) a la estabilidad global del sistema, ni se ha prestado atención al efecto que puede provocar la actividad metabólica sobre las propiedades del compartimento. Por eso, para poder obtener una visión más completa de las consecuencias físico-químicas del fenómeno de encapsulación y de las condiciones de viabilidad del sistema en su conjunto, es preciso un análisis más profundo del sistema, considerando estos atributos adicionales de la membrana. ¿Qué nuevas restricciones relacionadas con la estructura y dinamismo del compartimento surgen en este contexto?

Con objeto de poder estudiar de manera realista e íntegra el comportamiento dinámico del sistema considerado, en este capítulo se utiliza la plataforma ENVIRONMENT (ver Material y Métodos), que permite realizar simulaciones estocásticas de dinámicas protocelulares (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2007a). La principal ventaja es que este programa admite definir distintos dominios físicos de naturaleza y propiedades diferentes, y así la membrana vesicular puede ahora considerarse explícitamente, como un dominio en sí mismo, una estructura a la que pueden atribuírsele propiedades físicas y geométricas observadas en membranas lipídicas reales. Al margen de los procesos de reacción que suceden dentro de la vesícula y de los fenómenos de transporte o difusión de solutos a través de la membrana, pueden simularse los fenómenos de ensamblaje o intercambio de lípidos entre el medio acuoso y la estructura supramolecular (en bicapa cerrada). Pero además, es posible simular al mismo tiempo la evolución de los dominios como estructuras o

espacios dinámicos independientes. La estabilidad vesicular se postula condicionada por las dinámicas de la membrana y del interior acuoso, que según supuestos razonables están desacopladas (responden a la abundancia de lípidos en membrana y a la fuerza osmótica, respectivamente – ver detalles en Material y Métodos). Es por ello que ENVIRONMENT es idóneo para explorar los límites a la integridad y estabilidad dinámica global del sistema compartimentado, y dilucidar así su relevancia prebiótica.

Por supuesto, el estudio exhaustivo del sistema compartimentado con la plataforma exige la adecuación del modelo cinético empleado en el capítulo anterior (Figura 7.1) a las nuevas consideraciones generales de simulación, es decir, requiere la construcción de un verdadero modelo protocelular. Fundamentalmente, han de incluirse los atributos estructurales de la membrana y la geometría del compartimento, así como los procesos físicos de ensamblaje y desensamblaje lipídico, responsables del dinamismo de la membrana. Esto supone un aumento considerable en la complejidad del modelo, que a su vez lleva consigo el precio de un comportamiento dinámico más intrincado. Por eso, antes de analizar el modelo completo definitivo, se ha estimado conveniente realizar dos estudios preliminares con modelos más sencillos de vesículas desprovistas de metabolismo, a fin de validar la correcta implementación con la plataforma de las propiedades físicas de los compartimentos prebióticos, y determinar los principales rasgos de la dinámica estocástica del compartimento vesicular (Apartados 8.1 y 8.2). Una vez concluidos estos estudios, ya sí se aborda el modelo protocelular integral (Apartado 8.3). Así, con esta estrategia escalonada, los modelos vesiculares sirven como punto de partida en la construcción del modelo final y al mismo tiempo facilitan la interpretación de los resultados de éste.

8.1 Modelización de la estructura y dinamismo vesicular

En primer lugar se ha explorado el escenario de una vesícula lipídica preformada en equilibrio dinámico con el entorno (Figura 8.1)⁷⁴. Se trata del modelo celular más sencillo posible: una membrana en bicapa cerrada formada por el ensamblaje de moléculas de lípido provenientes del entorno y de un interior acuoso vacío, carente – por el momento – de procesos metabólicos. Por simplicidad, la vesícula se ha considerado de composición pura, es decir constituida exclusivamente por un único tipo de lípido *l*, encontrándose éste en equilibrio entre su forma ensamblada en membrana y su forma libre o disuelta en el medio acuoso (tanto intravesicular como extravesicular). *l* se postula como un lípido sencillo de síntesis abiótica, motivo que explica que la vesícula pueda concebirse como un modelo de compartimento prebiótico mínimamente estable, sustentado gracias a la disponibilidad del lípido en el entorno acuoso primigenio considerado⁷⁵.

⁷⁴ Si bien ENVIRONMENT permite simular la dinámica de los procesos de ensamblaje y desensamblaje de lípidos de membrana, todavía no permite simular la formación espontánea de vesículas *de novo*. Por eso todas las simulaciones de este trabajo parten ya de vesículas preformadas. En otras palabras, se comienza bajo el supuesto de que éstas han sido previamente autoensambladas de modo espontáneo a partir de lípidos disponibles en el entorno, en un escenario de tierra primitiva.

⁷⁵ La vesícula es un compartimento dinámico que puede llegar a sufrir división o ruptura. Pero en cualquier caso se fundamenta en un proceso reversible de autoensamblaje. Aquí se presupone su formación espontánea *ab initio*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el fenómeno de agregación sólo es posible si las condiciones externas son favorables. Lógicamente, si el lípido en el medio circundante estuviera muy diluido (es decir, si su concentración estuviera por debajo de la CVC – ver Apartado 6.2.2), la vesícula se disolvería espontáneamente. Aunque este otro fenómeno tampoco está contemplado expresamente, en las simulaciones siempre se consideran concentraciones de lípido en el medio acuoso del orden de la CVC, lo cual hace que sea

8.1.1 Elaboración de un modelo cinético de vesícula prebiótica

La construcción de un modelo cinético adecuado para ser implementado con ENVIRONMENT pasa por especificar una serie de parámetros generales del compartimento (ver Figura 8.1 y Material y Métodos). Para poder desarrollar un modelo cinético de vesícula prebiótica lo más realista posible, se ha recurrido a datos proporcionados por modelos experimentales de vesículas constituidas por compuestos anfifílicos sencillos de posible relevancia prebiótica. Concretamente, como primera aproximación se han tomado como referencia para la construcción del modelo *in silico* las características *in vitro* de las vesículas puras formadas por LA. Así, en la medida de lo posible los valores de los parámetros del modelo se han ajustado de acuerdo a las propiedades físicas de este tipo de vesículas, tanto en lo que respecta a aquellos atributos determinados en el Capítulo 6, como a los aspectos moleculares del LA, estimados a partir de otros trabajos experimentales. A continuación se describe en detalle cómo se han establecido los principales parámetros del modelo cinético.

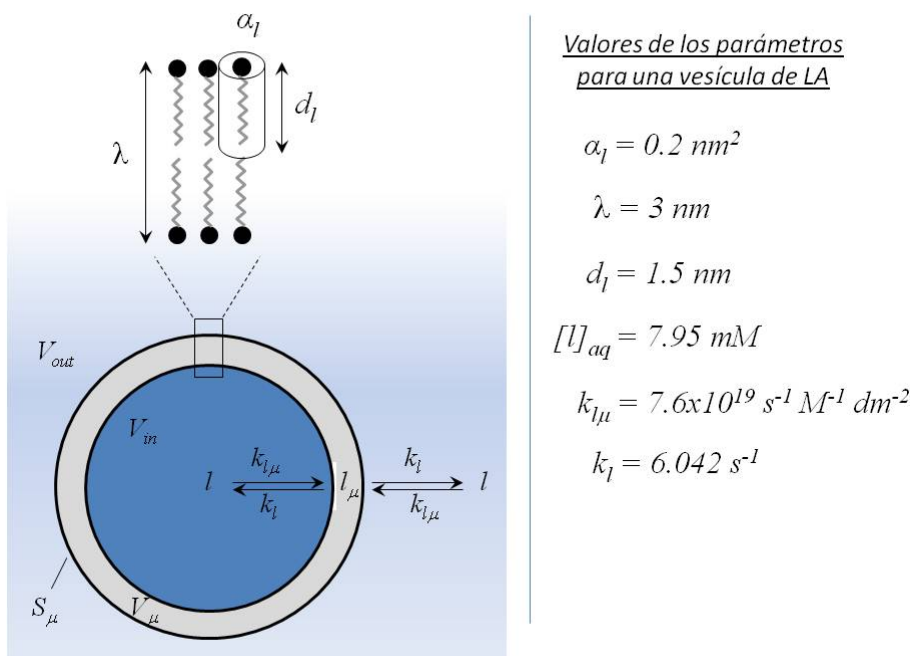


Figura 8.1 Modelo cinético de una vesícula lipídica de composición pura en equilibrio dinámico con el entorno. La membrana vesicular consiste en una estructura en bicapa cerrada formada por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas de un tipo de lípido *l* que se considera disponible en condiciones prebióticas. Existe un continuo intercambio (reversible) de moléculas de *l* entre la membrana y el medio acuoso, tanto con el interior vesicular como con el entorno, de modo que se define una concentración de equilibrio de monómero disuelto en agua $[l]_{aq}$, que coincidirá además con la CVC del lípido en cuestión (ver Capítulo 6). Las dimensiones moleculares del lípido (área de la cabeza polar α y longitud de la cadena hidrofóbica d) permiten relacionar directamente las propiedades geométricas de la membrana vesicular (superficie vesicular S_μ y volumen de membrana V_μ) con el número total de moléculas de lípido en la bicapa (ver Material y Métodos para una explicación más detallada). A la derecha, valores de los parámetros correspondientes al lípido LA.

razonable el supuesto del mantenimiento de agregados lipídicos preformados en una situación de equilibrio dinámico.

Aunque la superficie vesicular S_μ y el volumen del interior acuoso V_{in} se traten como variables y por tanto puedan admitirse cambios en la forma vesicular con el tiempo (según la relación superficie-volumen), la vesícula se considera inicialmente de forma esférica, con objeto de estandarizar las condiciones iniciales de simulación. Así, dado un determinado radio vesicular r deseado, resulta sencillo calcular las propiedades geométricas iniciales del compartimento⁷⁶:

$$S_\mu = 4 \pi r^2 \quad , \quad V_{in} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad \text{Ec. 8.1}$$

Por ejemplo, para el caso de una vesícula inicial de 50 nm de radio, $S_\mu = 3.14 \times 10^4 \text{ nm}^2$ y $V_{in} = 5.23 \times 10^5 \text{ nm}^3 = 5.23 \times 10^{-19} \text{ L}$. En cambio, el volumen del medio externo V_{out} se supone en todo momento constante con ENVIRONMENT, algo que resulta razonable si y sólo si se considera que el entorno es siempre mucho más amplio que la propia vesícula. Por precaución, aquí se ha asignado $V_{out} = 5.23 \times 10^{-16} \text{ L}$, es decir un valor tres órdenes de magnitud mayor que el volumen de la vesícula de 50 nm de radio. Este mismo valor de V_{out} es el que se ha empleado en lo sucesivo para los distintos experimentos realizados con ENVIRONMENT a lo largo de este trabajo de investigación.

En lo que respecta a las propiedades estructurales de la membrana vesicular, ésta se supone constituida por moléculas de LA dispuestas formando una bicapa cerrada. De acuerdo a experimentos recientes de resistencia a la compresión en monocapas, la superficie de la sección de la cabeza polar de este ácido graso resulta ser aproximadamente 0.2 nm^2 (Albertsen, comunicación personal). Así, se ha considerado $\alpha_1 = 0.2 \text{ nm}^2$. A su vez, el grosor de membrana λ y la longitud molecular d_l se han estimado a partir de datos estructurales proporcionados por estudios con membranas (bicapas) formadas por DLPC (Kucerka et al., 2005a)⁷⁷: $\lambda = 3 \text{ nm}$, $d_l = \lambda/2 = 1.5 \text{ nm}$.

Una vez que se dispone de las dimensiones moleculares del lípido y del tamaño inicial de la vesícula, puede ya sí determinarse el número inicial de moléculas de lípido ensambladas en la membrana $x_{i,\mu} : x_{i,\mu} = 2S_\mu/\alpha_1$ (ver Ecuación 11.17 de Material y Métodos)⁷⁸. De esta manera, si se tomara de nuevo el ejemplo de una vesícula esférica de 50 nm de radio ($S_\mu = 3.14 \times 10^4 \text{ nm}^2$), se deduciría que $x_{i,\mu} = 314159$. Al mismo tiempo, conociendo el tamaño poblacional de moléculas de lípido en la bicapa, puede estimarse el volumen *de membrana* V_μ . Para ello basta con disponer del volumen molecular del lípido v_l . En efecto, $V_\mu = v_l x_{i,\mu}$. El valor de v_l se ha obtenido aproximando la forma molecular del lípido (LA) a la geometría de un cilindro⁷⁹, es decir suponiendo $v_l = \alpha_1 d_l =$

⁷⁶ En el cálculo del volumen interno inicial se consideran las dimensiones enteras de la vesícula, despreciando de esta forma el hecho de que parte del volumen vesicular corresponda con la membrana y deba por tanto sustraerse. La aproximación es razonable, ya que el volumen ocupado por membrana es mínimo. Dicho de otro modo, el grosor de membrana es mucho menor que el radio vesicular ($\lambda \ll r$).

⁷⁷ En esta estimación se considera que a efectos prácticos el grosor de una bicapa constituida por LA es equivalente al de una bicapa de DLPC, ya que ambos tipos de moléculas tienen en común una cola hidrofóbica de igual longitud: ambos se componen de una cadena de acilo saturada de 12 carbonos. Un mismo razonamiento se utilizará más adelante para fijar un valor idéntico de grosor para aquellas membranas que contienen GML. La longitud molecular se estima directamente dividiendo el grosor de la membrana (bicapa) entre dos.

⁷⁸ Aquí la superficie vesicular va multiplicada por dos para considerar ambas caras de la bicapa lipídica, es decir la superficie total expuesta por todas las cabezas polares de lípidos en membrana.

⁷⁹ En la realidad se presenta un escenario más complicado: Las moléculas de ácido graso presentan individualmente geometrías cónicas, y por eso forman típicamente micelas. Pero en condiciones de equimolaridad entre su forma protonada (propia de ácido graso) y su forma ionizada (o de jabón), generan dímeros que sí son aproximadamente cilíndricos, y que de hecho empaquetan de forma natural en

0.3 nm³. Esto significa que $V_\mu = 9.42 \times 10^4 \text{ nm}^3$ para el caso que se viene considerando (el de una vesícula esférica de 50 nm de radio).

Como ya se ha señalado, la membrana vesicular, en la medida en la que se fundamenta en un proceso reversible de autoensamblaje de lípidos, ha de coexistir con la forma monomérica del lípido en solución, es decir, debe de encontrarse en equilibrio con la forma disuelta del lípido en el medio acuoso. Por eso, para dar coherencia al modelo es preciso definir una concentración de equilibrio del lípido (monomérico) en el medio acuoso, tanto dentro de la vesícula como fuera. En este caso se ha escogido de forma realista como concentración de equilibrio el valor que se obtuvo experimentalmente para la CVC del LA (Tabla 6.1)⁸⁰. Es decir:

$$[I]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = 7.95 \text{ mM} \quad \text{Ec. 8.2}$$

En cualquier caso, esto no significa que la concentración del lípido en el medio acuoso sea invariable. Al contrario, no debe olvidarse que se trata de un equilibrio dinámico, y por ello, tanto el número de moléculas de lípido en la membrana como su población (y por tanto su concentración) en el medio acuoso se consideran variables, ya que son susceptibles de sufrir cambios según las fluctuaciones en la dinámica de intercambio de lípidos entre el medio acuoso y la membrana. Lógicamente, de igual manera, la forma o geometría del compartimento (ya no necesariamente esférica) debe recalcularse a lo largo de cada simulación (S_μ y V_μ se actualizan según las Ecuaciones 11.17 y 11.18 de Material y Métodos). Ahora bien, ¿qué propiedades dinámicas concretas de autoensamblaje se han asignado al lípido del modelo?

Los únicos procesos posibles en este modelo simplificado inicial son precisamente los flujos de intercambio lipídico, es decir la incorporación de lípidos en membrana y el proceso contrario, su liberación al medio acuoso. Aunque no se dispone de información expresa sobre cómo es la cinética (la velocidad) de estos procesos en el caso del LA, sí puede al menos inferirse qué relación deben guardar la constante cinética de incorporación k_{in} y la constante cinética de liberación k_{out} para permitir que la concentración de equilibrio del lípido l en su forma disuelta sea 7.95 mM. De acuerdo con la condición de equilibrio, se obtiene lo siguiente (Ecuación 11.25 de Material y Métodos):

$$[I]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = \frac{k_{\text{in}}}{k_{\text{out}}} \frac{x_{l,\mu}}{S_\mu} \quad \text{Ec. 8.3}$$

Al tratarse de una vesícula pura, compuesta por un solo tipo l de lípido, S_μ puede sustituirse por $\alpha_l x_{l,\mu}/2$ (ver Ecuación 11.17 de Material y Métodos), de modo que esta última expresión se reduce a lo siguiente:

$$[I]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = \frac{k_{\text{in}}}{k_{\text{out}}} \frac{2}{\alpha_l} \quad \text{Ec. 8.4}$$

bicapas lamelares (así se explica que la formación de vesículas esté restringida a un pH próximo al pK_a del ácido) (Walde et al., 1994a).

⁸⁰ Atendiendo a los resultados de algunos trabajos experimentales con vesículas de ácidos grasos (Morigaki et al., 2003; Namani y Walde, 2005), siempre existe una cierta cantidad de ácido graso presente como surfactante monomérico no ensamblado coexistiendo con las vesículas. Además, esta concentración de monómero libre en solución no se incrementa al aumentar la concentración total de lípido en la suspensión vesicular, sino que permanece constante, tomando un valor equiparable al de la CVC. Por eso es habitual que ambos términos sean utilizados indistintamente para referirse al grado de solubilidad de un ácido graso (Walde et al., 2006).

de donde puede hallarse fácilmente el valor del cociente k_i/k_{lu} , que en este caso resulta $7.95 \times 10^{-20} \text{ M dm}^2$. Según este razonamiento, es posible expresar el valor de una de las constantes cinéticas en función de la otra. Aun así, para poder completar un modelo cinético razonablemente realista, sigue siendo necesario conocer o al menos tener una idea de la magnitud temporal de una de estas constantes.

Precisamente, en un estudio de simulación previo, Mavelli et al. (2008) han conseguido reproducir con ENVIRONMENT los resultados de experimentos reales de competición *in vitro* entre vesículas de OA (Chen et al., 2004), pudiendo de esta manera estimar el valor de los parámetros cinéticos k_{lu} y k_i de este ácido graso ($k_{lu} = 7.6 \times 10^{19} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ dm}^{-2}$; $k_i = 0.076 \text{ s}^{-1}$). Es bien probable que ambos parámetros tomen valores distintos en el caso de un ácido graso de cadena corta de posible relevancia prebiótica, tipo LA. Sin embargo, en este trabajo se ha supuesto como aproximación que la constante cinética de incorporación del lípido l en membrana es semejante a la del OA, y únicamente se ha reescalado el valor de k_i con objeto de cumplir la condición de la Ecuación 8.4 y adecuar el comportamiento en la medida de lo posible a las características del LA. Por consiguiente:

$$k_{lu} = 7.6 \times 10^{19} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ dm}^{-2} \quad \text{Ec. 8.5}$$

$$k_i = 6.042 \text{ s}^{-1} \quad \text{Ec. 8.6}$$

En la Figura 8.1 se resumen estos valores así como aquellos que se han asignado al resto de parámetros del modelo discutidos en las líneas previas⁸¹.

8.1.2 Dinámica estocástica e inestabilidad vesicular inducida por ruido

Los estudios de simulación realizados sobre este primer modelo han ido fundamentalmente dirigidos a explorar la dinámica estocástica del compartimento y esclarecer las condiciones generales de estabilidad de la vesícula alrededor del equilibrio. Esencialmente, se ha seguido un procedimiento semejante al que se describiera en el Apartado 5a del artículo (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2007a).

Como primera medida, se ha analizado el efecto del tamaño vesicular sobre la dinámica, siendo conscientes de que las fluctuaciones en los flujos de intercambio lipídico asociadas al confinamiento del lípido en volúmenes pequeños pueden ser una posible fuente de inestabilidad para el sistema celular. Así, se han realizado diversas simulaciones, todas ellas partiendo de una única vesícula esférica en equilibrio con el entorno acuoso, pero difiriendo en el tamaño inicial asignado a ésta (el radio vesicular se ha hecho variar en el rango 25 – 100 nm)⁸². La Figura 8.2 resume los resultados de este estudio. Como puede observarse, las vesículas se mantienen en un equilibrio dinámico, con valores de volumen interno V_m fluctuantes alrededor de su valor inicial.

⁸¹ Debe tenerse en consideración que gracias al hecho de incluir en el modelo valores de las constantes cinéticas realistas, con unidades explícitas, la dimensión temporal de las simulaciones dejará de estar expresada en unidades arbitrarias y los fenómenos que se deriven de ellas podrán referirse a una escala de tiempo específica, concretamente en segundos.

⁸² En todos los casos se ha procurado ensayar tamaños iniciales que puedan ser característicos de vesículas extruidas en laboratorio, con objeto de mantener el realismo del modelo y poder relacionar la dinámica simulada con el posible comportamiento real de vesículas pequeñas unilamelares (SUVs) o vesículas grandes unilamelares (LUVs). Las vesículas pequeñas unilamelares (comúnmente designadas con las siglas SUVs) son liposomas que tienen dimensiones comprendidas en el rango de 25 – 100 nm. Las vesículas grandes unilamelares (LUVs) poseen en cambio diámetros entre 100 nm y 1

Sin embargo, a tamaños vesiculares pequeños la magnitud de las fluctuaciones es mayor en términos relativos y termina provocando la desestabilización de la vesícula y su ruptura por crisis osmótica a tiempos relativamente cortos. En efecto, así como la vesícula inicial de 100 nm de radio se mantiene estable durante todo el tiempo de simulación (1 s), las vesículas de menor tamaño colapsan antes de terminar el experimento.

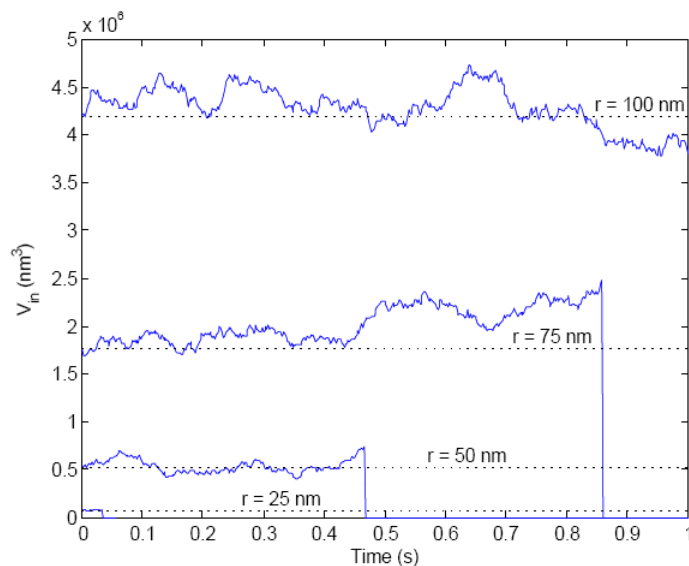


Figura 8.2 Estabilidad dinámica del compartimento según el tamaño vesicular. Se muestra la evolución temporal del volumen interno vesicular obtenida con diversas simulaciones. Cada una de ellas ha sido realizada comenzando con una única vesícula esférica en equilibrio con el entorno acuoso, con un cierto radio r distinto del de las demás. Según el tamaño inicial vesicular, el volumen del compartimento se mantiene fluctuante en torno a su valor inicial (líneas punteadas) más o menos tiempo. Las fluctuaciones asociadas a pequeños volúmenes suponen una crisis osmótica a tiempos relativamente cortos. Sólo la vesícula de mayor tamaño inicial ($r = 100$ nm) consigue mantenerse en un equilibrio estable, es decir con una membrana cerrada durante todo el tiempo de simulación.

La Figura 8.3A ilustra para el caso de la vesícula inicial de 100 nm de radio cómo la concentración del lípido en el interior acuoso se mantiene en todo momento fluctuando en torno a su valor esperable de equilibrio ($[l]_{aq}^{eq} = 7.95$ mM), en consistencia con un comportamiento cuasienergético del sistema alrededor del estado de equilibrio: todos los valores poblacionales posibles de lípido situados alrededor de dicho estado son explorados con cierta probabilidad tras un tiempo suficientemente largo. La Figura 8.3B muestra por el contrario la evolución temporal del factor de estabilidad Φ con la vesícula cuyo radio inicial es de 50 nm: las fluctuaciones relativamente altas en la dinámica de intercambio lipídico fuerzan a la vesícula a adoptar transitoriamente formas muy alejadas de la forma esférica de mínima energía, llegándose en cierto momento a traspasar los límites de estabilidad (Figura 8.3B, líneas discontinuas). Llegado a este punto, tanto en éste como en los demás casos de vesículas de reducido tamaño analizadas (Figura 8.2) la célula se rompe por crisis osmótica. No obstante, debe señalarse que de igual manera que las vesículas pequeñas en este estudio terminan directamente rompiéndose por crisis osmótica, podrían sufrir con anterioridad fenómenos de división si en lugar de rebasarse el límite $\Phi = 1 - \varepsilon$, se rebasara primero el límite $\Phi = \sqrt[3]{2}(1 + \eta)$ (ver Ecuación 11.22 de Material y Métodos)⁸³.

⁸³ En la práctica, dadas las circunstancias iniciales de una vesícula esférica en perfecto equilibrio con su entorno, resulta más probable el fenómeno de crisis osmótica que el de división, ya que siendo $\varepsilon = 0.21$ y η

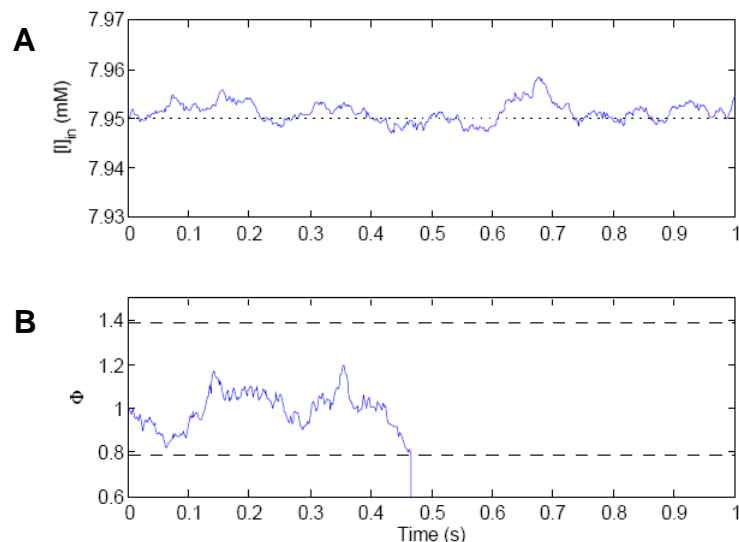


Figura 8.3 (A) Evolución temporal de la concentración del lípido en el interior acuoso para el caso de una vesícula en equilibrio dinámico con el entorno de forma inicial esférica y radio de 100 nm. La concentración de lípido se mantiene fluctuante alrededor de su valor de equilibrio $[l]_{aq}^{eq} = 7.95 \text{ mM}$ (línea punteada). (B) Evolución temporal del factor de estabilidad Φ para el caso de una vesícula en equilibrio inicialmente esférica y de 50 nm de radio. Φ fluctúa alrededor del valor correspondiente a una geometría vesicular esférica ($\Phi = 1$), pero las fluctuaciones son tales que consiguen producir cambios suficientes en la forma vesicular como para traspasar los límites de estabilidad (líneas discontinuas) antes de que finalice la simulación. A tiempo 0.46 s la vesícula sufre una crisis osmótica, ya que $\Phi < (1-\varepsilon)$ (ver Ecuación 11.22 y Apartado 11.3.3 de Material y Métodos).

La influencia que tiene el tamaño vesicular sobre la estabilidad estocástica en el equilibrio recuerda en gran medida al papel que jugaba el volumen de confinamiento en el mantenimiento de un metabolismo funcional (Capítulo 4). Al igual que entonces, el sistema se comporta como cuasienergético a volúmenes grandes (en este caso intravesiculares), y la desestabilización es inducida por el ruido interno y se manifiesta como un efecto de población finita en volúmenes pequeños. Es de esperar que exista por tanto un cierto volumen vesicular crítico V_m^c que sea necesario superar para que la vesícula se mantenga estable alrededor del equilibrio al menos durante un tiempo suficientemente largo. En las condiciones del experimento de la Figura 8.2 este valor podría localizarse próximo al volumen que corresponde a una vesícula esférica de 100 nm de radio (es decir, $V_m^c \approx 4.2 \times 10^{-18} L$). Aunque como ya se señaló en su momento, en realidad el asunto es más complicado: el límite aumentará (se volverá más restrictivo) a medida que se consideren tiempos de simulación mayores. No en vano, se trata de un límite probabilístico, dependiente de la escala de tiempo considerada. La probabilidad de una cadena de eventos que conduzcan a la desestabilización es siempre no nula; a tiempo infinito se convierte en un fenómeno seguro para cualquier volumen considerado. En cualquier caso, el tamaño vesicular es determinante en la probabilidad de mantenimiento a tiempos finitos, por lo que no podrá concebirse el desarrollo del protometabolismo modelo en una vesícula lipídica demasiado pequeña.

Hasta ahora se ha estudiado la vesícula en un medio acuoso puro, pero ¿qué sucede al considerar en su lugar un escenario más realista en el que la vesícula se encuentre en un medio acuoso con sales u otros osmolitos disueltos? ¿Puede la presencia de estos compuestos que actúan como tampón osmótico influir en la estabilidad vesicular? Para responder a esta pregunta se ha

= 0.1, el límite $\Phi = 1-\varepsilon$ queda más próximo al estado de equilibrio ($\Phi = 1$) que el límite $\Phi = \sqrt[3]{2}(1+\eta)$ (Material y Métodos).

incluido en el modelo de la Figura 8.1 un cierto osmolito no reactivo, denominado B. Por simplicidad, éste no puede atravesar la membrana, pero su concentración de partida se supone equivalente tanto en el medio acuoso extravesicular como intravesicular con objeto de asegurar condiciones iniciales de isoosmolaridad. Los resultados de simulación demuestran que ya la sola presencia del osmolito en concentraciones relativamente modestas (por ejemplo $[B]_{\text{out}} = [B]_{\text{in}} = 5$ mM) supone un importante efecto estabilizador sobre la vesícula alrededor del equilibrio (Figura 8.4A). Pero además, tal como confirma la Figura 8.4B, la magnitud de las fluctuaciones en el volumen interno disminuye al aumentar la concentración de B. Lógicamente, a medida que el tampón osmótico se hace más efectivo, la presión osmótica a ambos lados de la membrana se ve menos descompensada por las fluctuaciones en la concentración del lípido en el interior del compartimento. Con ello, se propicia aún una mayor estabilidad vesicular.

En conclusión, la estabilidad de la vesícula aumenta conforme crece el tamaño de ésta, pero también conforme más enriquecido está el medio circundante en osmolitos. La presencia de concentraciones relativamente altas de un osmolito puede posibilitar que se mantengan durante largos periodos de tiempo estables en torno al equilibrio vesículas pequeñas que de otra manera serían altamente inestables.

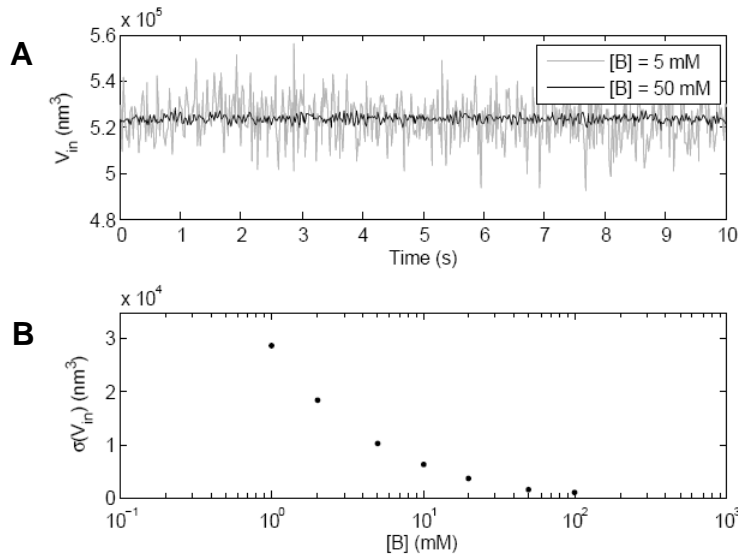


Figura 8.4 Efecto estabilizador de un tampón osmótico. (A) Evolución temporal del volumen intravesicular en el caso de una vesícula inicial de 50 nm de radio en presencia de un osmolito B en el medio acuoso (tanto interno como externo). Al contrario que en el medio acuoso puro (Figura 8.3B), la vesícula, a pesar de su reducido tamaño, consigue mantenerse estable en torno al estado de equilibrio durante todo el tiempo de simulación, con valores de volumen interno fluctuantes alrededor de su valor inicial. Al aumentar la concentración de B de 5 mM a 50 mM, la magnitud de las fluctuaciones disminuye. (B) El estudio se ha extendido para otras concentraciones de B, comprobándose que el coeficiente de variación obtenido en el volumen interno vesicular a lo largo del tiempo de simulación escala de modo inverso con la concentración de B.

Por último, antes de pasar a estudiar modelos celulares más elaborados, merece la pena detenerse a explorar el comportamiento vesicular ante una perturbación externa que pueda suponer (al menos temporalmente) un escape de la situación de equilibrio. Más concretamente, se ha analizado la respuesta de una vesícula preformada, en equilibrio con una solución acuosa tamponada, frente a la adición externa de una cierta cantidad suplementaria de lípido. Este tipo de situación puede asemejarse en cierto grado a aquella que podría darse en un tubo de ensayo con ciertos métodos de formación de vesículas *in vitro*, basados por lo común en la inyección de una

solución concentrada de monómeros o micelas en una solución tamponada a pH intermedio (Blöchliger et al., 1998). Para evitar condiciones que puedan suponer prematuramente la inestabilidad de la vesícula por motivos intrínsecos, se ha escogido inicialmente un radio vesicular de 50 nm y una concentración del tampón relativamente alta ($[B]_{out} = [B]_{in} = 50 \text{ mM}$).

La Figura 8.5 muestra los resultados obtenidos al considerar inicialmente la adición puntual sobre el medio acuoso externo de una cantidad de lípido equivalente al doble de aquella presente en la membrana vesicular. En consistencia con este pulso de lípido, se ha supuesto como condición de partida que, mientras que $[l]_{in} = [l]_{aq}^{eq} = 7.95 \text{ mM}$, $[l]_{out} = [l]_{aq}^{eq} + (2x_{l,\mu}/(N_A V_{out})) = 9.95 \text{ mM}$. La adición de lípido (en la Figura 8.5, a tiempo cero), conlleva en primer lugar una respuesta instantánea en el volumen intracelular, que se reduce para compensar la diferencia de presión osmótica establecida entre el interior y el exterior vesicular. Seguidamente, una vez que se ha restablecido el equilibrio osmótico, se observa un aumento progresivo de la superficie vesicular mientras el volumen interno permanece prácticamente constante (Figura 8.5A). Esto es indicativo de que el exceso de lípido disuelto en el medio acuoso externo va siendo incorporado en la membrana. Sin embargo, a medida que la relación superficie-volumen de la vesícula va descompensándose, aumenta el valor del factor de estabilidad Φ , hasta que una vez alcanzado el límite superior de estabilidad, la vesícula original se divide en dos vesículas hijas (Figura 8.5B). Este proceso se repite más lentamente con las sucesivas generaciones de vesículas, hasta que termina de redistribuirse por completo el lípido en exceso y se recupera el equilibrio de ensamblaje lipídico.

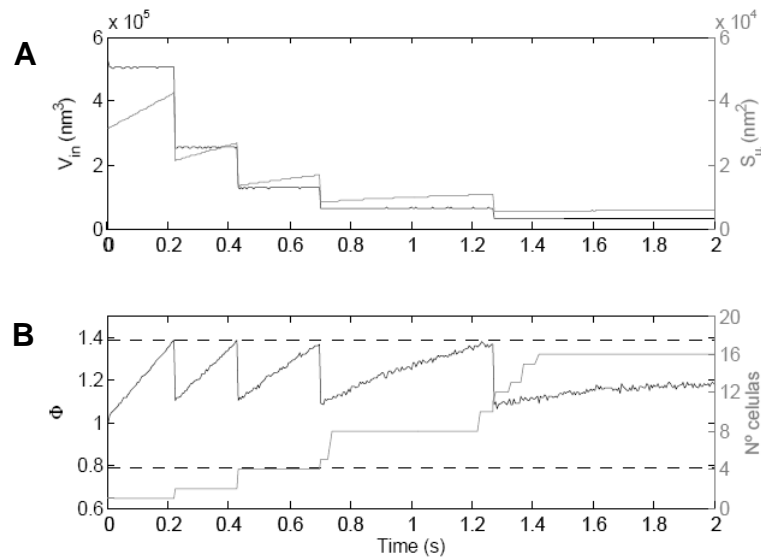


Figura 8.5 Respuesta vesicular a la adición externa de lípido. Se simula la repercusión de añadir, sobre la suspensión de una vesícula esférica de 50 nm de radio en equilibrio con un medio acuoso tamponado ($[B]_{out} = [B]_{in} = 50 \text{ mM}$), una cantidad de lípido doble que la presente en la membrana vesicular. De este modo se fija como condición inicial $[l]_{out} = 9.95 \text{ mM}$; $[l]_{in} = [l]_{aq}^{eq} = 7.95 \text{ mM}$. (A) Se representa la evolución temporal del volumen interno V_{in} y superficie vesicular S_v del compartimento original. (B) El curso del factor de estabilidad Φ en picos de sierra (sólo representado para la “célula madre”) es indicativo de que la vesícula sufre varios fenómenos de división, lo cual se demuestra a través del seguimiento del número total de vesículas en suspensión: la población de vesículas crece.

A la vista de la evolución temporal del número total de vesículas (Figura 8.5B, en gris), queda patente que en las condiciones de estudio todas las sucesivas divisiones son exitosas, pues conducen a un incremento (duplicación) de la población vesicular. De este modo, uno podría estar

tentado de proponer el mecanismo descrito (basado en la incorporación neta de lípido) como un modo sencillo y eficaz de reproducción celular. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este tipo de experimento, el incremento en el número de vesículas se acompaña inevitablemente de una reducción progresiva del tamaño vesicular (Figura.8.5A, curva negra). Esto supone la formación de vesículas que, al ser cada vez más pequeñas, son también más inestables y pueden colapsar con mayor facilidad. No es por tanto difícil de imaginar que ante una perturbación suficientemente fuerte o prolongada en la concentración externa de lípido, el linaje de vesículas pueda incluso terminar extinguiéndose. En todo caso, el estudio realizado sí sirve como un primer anticipo de la riqueza del comportamiento dinámico que puede experimentar el compartimento en condiciones alejadas del equilibrio.

8.2 Modelización de la permeabilidad a través de membrana

Una vez descritos los principales rasgos dinámicos y condicionantes para la estabilidad de una vesícula lipídica de composición pura alrededor del equilibrio, se ha trasladado el foco de atención a un escenario un poco más complejo (Figura 8.6). Ahora se considera una vesícula de composición mixta, formada por dos tipos de lípidos distintos: l y L. Ambas especies ensambladas en membrana se encuentran en equilibrio con su forma monomérica disuelta en el medio acuoso, pero difieren entre sí en sus propiedades moleculares dinámicas y geométricas. Así como l representa un lípido de cadena sencilla de posible relevancia prebiótica (por ejemplo, un ácido graso), L es tratado como un compuesto anfifílico relativamente más complejo (con una cabeza polar más voluminosa), y por tanto más evolucionado, que podría haberse derivado a partir de l en un proceso de síntesis posterior (por ejemplo, un derivado glicerol del ácido graso) – en todo caso lo suficientemente sencillo para poder considerar la vesícula en un escenario todavía muy primitivo. Por otra parte, en consistencia con una hipótesis de sopa primitiva, el medio acuoso externo se considera un gran reservorio de nutrientes (por comodidad designados como una sola especie X), compuestos sencillos que son capaces de atravesar la membrana vesicular por difusión pasiva y acceder así al interior. Se trata de evaluar en qué medida afecta la composición lipídica de membrana a la velocidad de adquisición de nutrientes, y cuál es el efecto que genera la incorporación de nutrientes sobre la dinámica global del compartimento.

8.2.1 Modelo cinético

Para poder desarrollar un modelo cinético lo más realista posible, se ha seguido un planteamiento semejante al del apartado anterior: en la medida de lo posible, se ha procurado ajustar los valores de los parámetros del compartimento (Figura 8.6) de acuerdo a las propiedades físicas que exhiben *in vitro* las membranas formadas por ciertos lípidos sencillos monoacílicos, supuestas de carácter primitivo. En este caso, al haberse ideado un modelo de vesícula primitiva de composición mixta, se han tomado principalmente como referencia las características de las membranas constituidas por combinaciones binarias, bien de LA/GML o de LA/DLPC (mezclas ya analizadas en el Capítulo 6). Es decir, al lípido l se le han asignado nuevamente unos valores de los parámetros adecuados a las propiedades del LA (postulado de relevancia prebiótica). En cambio, en lo que respecta al lípido más complejo, L, se le han atribuido bien las propiedades moleculares del GML, o bien las del DLPC (tanto uno como otro representan compuestos anfifílicos derivados del LA que pudieron coexistir con éste en fases tempranas de evolución de la membrana). En la Tabla 8.1 se resumen los parámetros físicos particulares de estos compuestos.

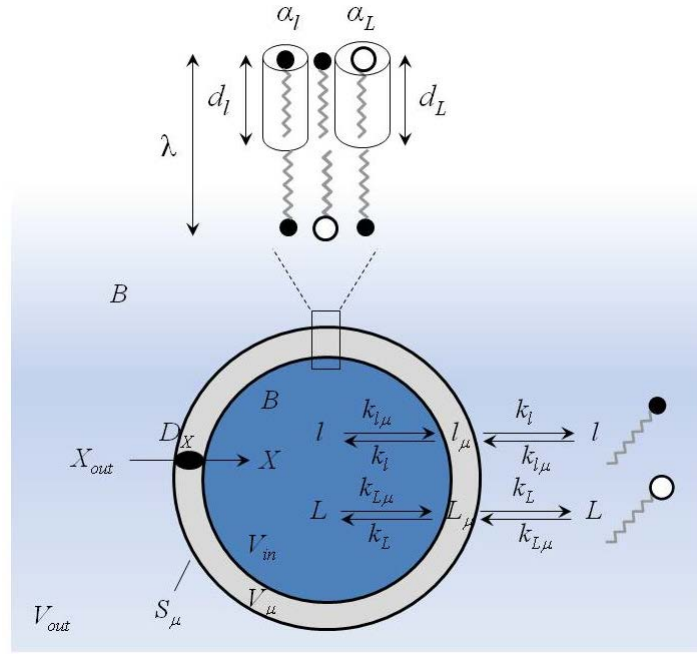


Figura 8.6 Modelo cinético de una vesícula lipídica preformada de composición mixta expuesta a un entorno rico en un cierto nutriente X. Se supone que X toma concentración constante en el medio externo (considerado como una fuente ilimitada de nutrientes), y que es capaz de acceder al interior vesicular por difusión pasiva a través de membrana. En la bicapa de membrana coexisten dos tipos de lípidos sencillos, supuestamente de naturaleza ancestral: l y L, siendo L un compuesto derivado de l (y por tanto algo más complejo y evolucionado). Ambos se encuentran en equilibrio dinámico con su forma disuelta en el medio acuoso (tanto interno como externo), aunque cada cual presenta una geometría molecular y unas propiedades dinámicas particulares (los valores asignados a los parámetros moleculares figuran en la Tabla 8.1). La abundancia relativa de cada tipo de lípido en la membrana determina la concentración de equilibrio de ambos lípidos en el medio acuoso, así como la composición y propiedades de permeabilidad de la membrana. El coeficiente de difusión molecular de la especie X a través de la bicapa D_X varía en función de la proporción de moléculas de l y L en membrana (ver texto). La especie B actúa como tampón osmótico, y se ha añadido por razones de estabilidad vesicular.

Tabla 8.1 Valores de los parámetros del modelo referidos a las propiedades moleculares de los lípidos que integran la membrana vesicular, según la clase de lípido considerada.

Lípido	α_l (nm ²) ⁺	λ (nm) ⁺	d_l (nm) ⁺	$[l]_{aq}^{eq}$ (mM) [*]	$k_{l\mu}$ (s ⁻¹ M ⁻¹ dm ⁻²) [†]	k_l (s ⁻¹) [†]
LA	0.2	3	1.5	7.95	7.6×10^{19}	6.042
GML	0.4	3	1.5	0.05	7.6×10^{19}	7.6×10^{-2}
DLPC	0.6	3	1.5	0.01	7.6×10^{19}	2.28×10^{-2}

⁺ Datos estimados a partir de resultados experimentales de otros trabajos (Kucerka et al., 2005a; A. N. Albertsen, comunicación personal).

^{*} Los valores de concentración de equilibrio del monómero disuelto en medio acuoso se han obtenido en cada caso a partir del valor experimental de la CVC (para el LA, determinado en el Apartado 6.2.2; para el GML y DLPC determinado por colaboradores (S. Maurer y P.-A. Monnard)). Sin embargo sólo son válidos al considerar membranas de composición pura, formadas exclusivamente por el tipo de lípido indicado. Lógicamente el valor de $[l]_{aq}^{eq}$ cambiará en dispersiones mixtas en las que el lípido de referencia l coexista con otro lípido de distinta clase, tal como se describe en el texto.

[†] Como aproximación, se presupone que todos los lípidos considerados comparten una constante cinética de incorporación en membrana semejante a la del OA (Mavelli et al., 2008), y que únicamente difieren en el valor de k_l , que se ha reescalado con objeto de cumplir en cada caso con la concentración de equilibrio o CVC correspondiente a la dispersión pura del lípido (condición de la Ecuación 8.4).

En lo que se refiere a las dimensiones moleculares de los lípidos del modelo, tanto l como L se han considerado moléculas de igual longitud ($d_l = d_L = \lambda/2 = 1.5$ nm), siendo como tanto el LA como el GML y el DLPC comparten todos ellos en su estructura la misma cadena hidrofóbica. Esto significa que el grosor de la bicapa se supone constante e independiente de la composición lipídica: $\lambda = 3$ nm. Ahora bien, los lípidos l y L sí difieren en el área de sección de la cabeza polar, en consistencia con las diferencias tan notorias existentes en la complejidad del grupo polar entre el LA, el GML y el DLPC. Así, $\alpha_l = 0.2$ nm², mientras que $\alpha_L = 0.4$ nm² o bien 0.6 nm² (según se tomen por referencia las características moleculares del GML o del DLPC, respectivamente – Tabla 8.1).

Al igual que en el apartado anterior, la vesícula se considera inicialmente de forma esférica, de modo que resulta sencillo calcular las propiedades geométricas iniciales del compartimento (superficie vesicular S_μ y volumen del interior acuoso V_{in}) dado un cierto radio vesicular r (ver de nuevo Ecuación 8.1). Sin embargo, merece la pena dedicar atención expresa al cálculo del número inicial de moléculas de lípido presentes en la membrana. Al tratarse de una membrana de composición mixta, para poder relacionar la geometría del compartimento con el número de moléculas lipídicas en la bicapa no basta con conocer las dimensiones moleculares de los lípidos participantes, sino que es necesario saber además su abundancia relativa. De acuerdo con la coexistencia en la bicapa de l y L, $2S_\mu = \alpha_l x_{l,\mu} + \alpha_L x_{L,\mu}$ (según la Ecuación 11.17 de Material y Métodos), lo que traducido en términos de la fracción molar del lípido L en membrana ($\chi_{molar}^L = x_{L,\mu}/(x_{l,\mu} + x_{L,\mu})$ ⁸⁴) equivale a:

$$2S_\mu = (x_{l,\mu} + x_{L,\mu})(\alpha_l(1 - \chi_{molar}^L) + \alpha_L \chi_{molar}^L) \quad \text{Ec. 8.7}$$

Despejando en esta expresión el tamaño poblacional de moléculas de l en la bicapa $x_{l,\mu}$, queda:

$$x_{l,\mu} = \frac{2S_\mu}{\alpha_l(1 - \chi_{molar}^L) + \alpha_L \chi_{molar}^L} - x_{L,\mu} \quad \text{Ec. 8.8}$$

Si ahora se sustituye $x_{L,\mu}$ por $(x_{l,\mu} + x_{L,\mu})\chi_{molar}^L$ y se integra este término en el primero del mismo miembro, resulta la siguiente ecuación:

$$x_{l,\mu} = \frac{2S_\mu - (x_{l,\mu} + x_{L,\mu})(\alpha_l(1 - \chi_{molar}^L) + \alpha_L \chi_{molar}^L)\chi_{molar}^L}{\alpha_l(1 - \chi_{molar}^L) + \alpha_L \chi_{molar}^L} \quad \text{Ec. 8.9}$$

que puede simplificarse considerando la expresión de la Ec. 8.7, obteniéndose finalmente:

$$x_{l,\mu} = 2S_\mu \frac{1 - \chi_{molar}^L}{\alpha_l(1 - \chi_{molar}^L) + \alpha_L \chi_{molar}^L} \quad \text{Ec. 8.10}$$

⁸⁴ Conviene señalar que aquí se ha utilizado el término χ_{molar}^L , que hasta ahora aludía a la fracción molar del lípido en la mezcla global, para referirse a la fracción molar del lípido en membrana. Esto se debe a que la mayoría de los experimentos *in vitro*, que son en esencia la principal fuente para ajustar los parámetros del modelo, se realizan en condiciones de concentración de lípido en las que predominan con mucho los agregados vesiculares, de modo que las mismas proporciones molares relativas que guardan los lípidos en la preparación sirven como estimación de las proporciones en membrana. En el modelo teórico se ha procurado reproducir los mismos ratios de los experimentos para las concentraciones relativas en membrana, prescindiendo naturalmente de controlar la proporción en la muestra global, que deja de ser informativa: obviamente, al considerarse una sola vesícula en un medio muy amplio, el ratio molar en la muestra global aquí sí está fundamentalmente condicionado por la solubilidad de ambos lípidos, es decir por la concentración de equilibrio en medio acuoso de cada especie, siendo claramente distinto al ratio en membrana.

De forma análoga se obtiene el número de moléculas del lípido L en membrana $x_{L,\mu}$:

$$x_{L,\mu} = 2S_\mu \frac{\chi_{\text{molar}}^L}{\alpha_1(1 - \chi_{\text{molar}}^L) + \alpha_L \chi_{\text{molar}}^L} \quad \text{Ec. 8.11}$$

Supongamos por ejemplo el caso hipotético de una vesícula esférica de 50 nm de radio ($S_\mu = 3.14 \times 10^4 \text{ nm}^2$) con una membrana compuesta por LA/DLPC en proporción molar relativa 3:1, lo que significa un modelo de dos lípidos, I y L, en el que $\chi_{\text{molar}}^L = 0.25$. En tal caso resultaría $x_{I,\mu} = 157080$ y $x_{L,\mu} = 52360$.

En cuanto a las propiedades dinámicas de los lípidos, los valores de las constantes cinéticas de incorporación en membrana y liberación al medio acuoso han sido estimados para cada tipo de lípido particular a partir del valor experimental de la CVC en su correspondiente dispersión pura, siguiendo en esencia un razonamiento semejante al empleado con el modelo anterior (Apartado 8.1.1): En ausencia de mezclas con otros lípidos, la concentración de equilibrio del lípido de interés en el medio acuoso se estima equivalente a su CVC; y al mismo tiempo, de acuerdo con la condición de equilibrio lipídico, la concentración de equilibrio se relaciona con las constantes cinéticas de incorporación y liberación de membrana (según las Ecuaciones 11.25 y 11.26 de Material y Métodos, que se simplifican mucho tratándose de vesículas de composición pura – ver Ecuación 8.4). Así, se ha supuesto como antes que los tipos de lípido considerados comparten un valor de la constante cinética de incorporación en membrana semejante a aquel del OA ($k_{\text{I}\mu} = k_{\text{L}\mu} = 7.6 \times 10^{19} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ dm}^{-2}$), y tan sólo se ha reajustado el valor de la constante de liberación para adecuarse en cada caso al valor característico de la CVC o concentración monomérica de equilibrio en la dispersión pura del lípido (Tabla 8.1). Por ejemplo, considerando como lípido L del modelo el DLPC, cuya CVC es 0.01 mM:

$$k_L = 0.01 \times 10^{-3} k_{\text{L}\mu} \alpha_L / 2 = 2.28 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \quad \text{Ec. 8.12}$$

Así como las constantes cinéticas de incorporación y liberación propias de cada clase de lípido se suponen invariables, e independientes por tanto de la composición lipídica de la membrana, la concentración de equilibrio en medio acuoso de cada especie lipídica involucrada en el modelo varía según las proporciones en las que se combine con el otro lípido presente en la mezcla, del mismo modo que en los resultados experimentales la CVC sufre cambios al modificar el ratio molar lipídico de la preparación (Tablas 6.1 y 6.2). Nótese cómo la ecuación general de equilibrio lipídico (Ecuación 11.25 de Material y Métodos), ahora que la membrana se considera de composición binaria, conduce – teniendo en cuenta que $2S_\mu = \alpha_I x_{I,\mu} + \alpha_L x_{L,\mu}$ – a las siguientes expresiones de concentración de equilibrio:

$$[I]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = 2 \frac{k_I}{k_{\text{I}\mu}} \frac{x_{I,\mu}}{\alpha_I x_{I,\mu} + \alpha_L x_{L,\mu}}; \quad [L]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = 2 \frac{k_L}{k_{\text{L}\mu}} \frac{x_{L,\mu}}{\alpha_I x_{I,\mu} + \alpha_L x_{L,\mu}} \quad \text{Ec. 8.13}$$

(fórmulas que en todo caso son bien distintas de la Ecuación 8.4 hallada para membranas puras). Expresadas en función de la fracción molar del lípido L en membrana χ_{molar}^L :

$$[I]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = 2 \frac{k_I}{k_{\text{I}\mu}} \frac{1 - \chi_{\text{molar}}^L}{\alpha_1(1 - \chi_{\text{molar}}^L) + \alpha_L \chi_{\text{molar}}^L}; \quad [L]_{\text{aq}}^{\text{eq}} = 2 \frac{k_L}{k_{\text{L}\mu}} \frac{\chi_{\text{molar}}^L}{\alpha_1(1 - \chi_{\text{molar}}^L) + \alpha_L \chi_{\text{molar}}^L} \quad \text{Ec. 8.14}$$

Esto significa que a medida que la membrana se enriquece en lípido L, la concentración de equilibrio de I disuelto en la fase acuosa se aleja de su valor característico cuando I está solo en solución, es decir de la CVC en una dispersión pura de I. Y lo mismo sucede a la inversa, considerando la concentración de equilibrio de L al aumentar la fracción molar de I. Por ejemplo,

tomando de nuevo como referencia el caso de una vesícula mixta formada por LA/DLPC, si el ratio molar l/L en membrana fuese 3:1, $[A]_{aq}^{eq}=3.975 \text{ mM}$ y $[L]_{aq}^{eq}=0.005 \text{ mM}$, mientras que si fuese 1:3, $[A]_{aq}^{eq}=0.795 \text{ mM}$ y $[L]_{aq}^{eq}=0.009 \text{ mM}$.⁸⁵ Por otro lado, si en el primer supuesto la concentración total de lípidos en fase acuosa es aproximadamente 4 mM, en el segundo es sensiblemente menor: inferior a 1 mM. Probablemente el mecanismo aquí contemplado (Ecuación 8.14) dé explicación, al menos parcial, de porqué el valor experimental de la CVC del LA disminuye en las mezclas con GML ó DLPC.

Finalmente, falta por describir las consideraciones respecto al soluto X, que es parte integrante esencial de este modelo. Al postularse como un nutriente sencillo de síntesis abiótica (aportado por procesos externos), su concentración en el medio acuoso externo se supone constante, bajo la hipótesis de un escenario de sopa primitiva. Concretamente, se considera en todo momento $[X]_{out} = 10 \text{ mM}$. Por el contrario, su concentración en el medio acuoso interno se supone variable (inicialmente $[X]_{in} = 0 \text{ mM}$), con objeto de analizar el proceso de flujo de X a través de la membrana vesicular y la velocidad de equilibrado.

De modo realista, la permeabilidad de solutos a través de la membrana se supone condicionada por la composición lipídica de la bicapa. Como aproximación, a la especie X se le han atribuido propiedades de permeabilidad semejantes a las de la CF, y se ha considerado que su coeficiente de difusión molecular a través de la bicapa D_X^m varía en función de la proporción de moléculas de l y L en membrana siguiendo una función no lineal equivalente a la que se describiera para la CF con vesículas de igual naturaleza (bien LA/GML ó LA/DLPC) (Apartado 6.3.3). Así, cuando la membrana del modelo se considera constituida por mezclas LA/GML, se ha implementado con ENVIRONMENT la siguiente función de permeabilidad dependiente de composición (ver Material y Métodos):

$$D_X^m = 3.776 \times 10^5 + 1.43 \times 10^8 (\chi_{molar}^L) - 3.605 \times 10^8 (\chi_{molar}^L)^2 + 1.967 \times 10^8 (\chi_{molar}^L)^3 \quad \text{Ec. 8.15}$$

quedando D_X^m expresado en unidades $\text{dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Y cuando se considera la membrana formada por LA/DLPC, el coeficiente de difusión de X (de nuevo en las mismas unidades) se ha calculado de este otro modo:

$$D_X^m = 3.776 \times 10^5 + 1.003 \times 10^8 (\chi_{molar}^L) - 3.563 \times 10^8 (\chi_{molar}^L)^2 + \dots \quad \text{Ec. 8.16}$$

$$\dots 4.208 \times 10^8 (\chi_{molar}^L)^3 - 1.639 \times 10^8 (\chi_{molar}^L)^4$$

En definitiva, la abundancia relativa de cada lípido ya no sólo es determinante para relacionar las propiedades geométricas del compartimento con el número inicial de moléculas de lípido presentes en la membrana, o para hallar la concentración de equilibrio de ambos lípidos en el medio acuoso, sino también para dilucidar la permeabilidad del nutriente X a través de la bicapa. Y ésta es seguramente la novedad más interesante con respecto a los modelos vesiculares de composición pura.

B es una especie que aunque no permea a través de la membrana, actúa como osmolito, y que ha sido incluida para reforzar la estabilidad vesicular (recordar Figura 8.4). Se le ha asignado una concentración externa $[B]_{out} = 100 \text{ mM}$ y una concentración inicial interna $[B]_{in} = 110 \text{ mM}$, con objeto de compensar inicialmente las diferencias de concentración debidas al soluto X y asegurar condiciones iniciales de isoosmolaridad en las que el factor de estabilidad Φ se mantenga igual a 1. En todo caso los valores de concentración escogidos están dentro del rango de

⁸⁵ Ambas situaciones servirían en cualquier caso para poner de manifiesto que con los supuestos generales de simulación, el ratio molar lipídico en la mezcla global puede ser bien distinto al de membrana.

concentraciones que se suelen emplear para la clase de tampones utilizados en los experimentos *in vitro* con vesículas de ácidos grasos, en especial el tampón bicina 0.1 M usado en este trabajo de investigación (Apartado 6.1.1).

8.2.2 Dinámica estocástica: permeabilidad dependiente de composición de membrana

El principal objetivo de las simulaciones estocásticas con este modelo ha sido estudiar la permeabilidad a través de la membrana vesicular y el proceso de equilibrado del sistema: cómo es la cinética de incorporación del soluto X, y cómo afecta ésta a la geometría y estabilidad de la vesícula (inicialmente considerada en equilibrio lipídico con su entorno).

En primer lugar se ha analizado la dinámica del sistema considerando la membrana vesicular constituida sólo por lípido de tipo I. A efectos de los cálculos a realizar con las ecuaciones que acaban de presentarse para el modelo vesicular de composición mixta (en especial el cálculo del coeficiente de difusión molecular), se ha supuesto un ratio molar lipídico de LA/GML o de LA/DLPC de 1:0 ($\chi_{molar}^L = 0$). En todo caso, paralelamente a la simulación estocástica con ENVIRONMENT, se ha estimado oportuno analizar la dinámica por metodología determinista a fin de comprobar la correcta implementación del modelo y la validez del resultado de simulación, para lo cual se ha diseñado en Matlab un algoritmo específico de integración numérica que considera el equivalente determinista de todos aquellos cálculos relacionados con la estructura y dinamismo del compartimento contemplados con ENVIRONMENT (Apéndice III). Las Figuras 8.7 y 8.8 resumen el resultado tanto del análisis estocástico como del determinista para el caso de una vesícula inicial de 50 nm de radio.

La Figura 8.7 muestra la cinética de incorporación del nutriente X en la vesícula en términos de la evolución temporal de la concentración de X en el interior acuoso vesicular. Aunque en un sentido global se parte de condiciones iniciales de isoosmolaridad, de acuerdo al gradiente de concentración de X entre el exterior y el interior vesicular, se produce un flujo neto de entrada de este soluto al medio acuoso intravesicular (inicialmente desprovisto de X) (Ecuación 11.1 de Material y Métodos). Su concentración interna por tanto va aumentando (ya sea con ruido o sin él) hasta alcanzar el equilibrio en el cual $[X]_{in} = [X]_{out} = 10$ mM. Se observa que el resultado del análisis determinista, sin ruido (Figura 8.7, curva en gris), reproduce fielmente la tendencia general obtenida mediante una simulación estocástica, con ruido (Figura 8.7, curva en negro), al tener igualmente en cuenta la dinámica del compartimento. Por otro lado, en la Figura 8.7 también se ha recogido la solución predicha por integración explícita de la ecuación de permeabilidad (Ecuación 11.1 de Material y Métodos)⁸⁶ bajo el supuesto de que $D_X^m = 3.78 \times 10^5$ dm² mol⁻¹ s⁻¹. En tal caso resulta una trayectoria (Figura 8.7, curva punteada) ligeramente adelantada respecto a la de los dos casos anteriores (bien apreciable en el inserto). Esta diferencia probablemente se deba precisamente al hecho de no contemplar la dinámica del volumen interno vesicular, que habrá de aumentar en respuesta a la tensión osmótica generada por la entrada de moléculas de X, provocando en consecuencia un cierto retraso en el curso de crecimiento de $[X]_{in}$.

⁸⁶ Esta integración explícita se ha realizado siguiendo los mismos pasos que se detallan en el Apéndice II, pero despejando $[X]_{in}$ en lugar de $[X]_{out}$. De este modo resulta la siguiente expresión: $[X]_{in} - [X]_0 = ([X]_{eq} - [X]_0)(1 - e^{-kt})$, donde k puede sustituirse por el valor de $3D_X^m/(\lambda N_{Ar})$ (según las Ecuaciones 11.5 y 11.6 de Material y Métodos), obteniéndose así la trayectoria de $[X]_{in}$ una vez conocido su valor inicial $[X]_0$ y su valor final o de equilibrio $[X]_{eq}$.

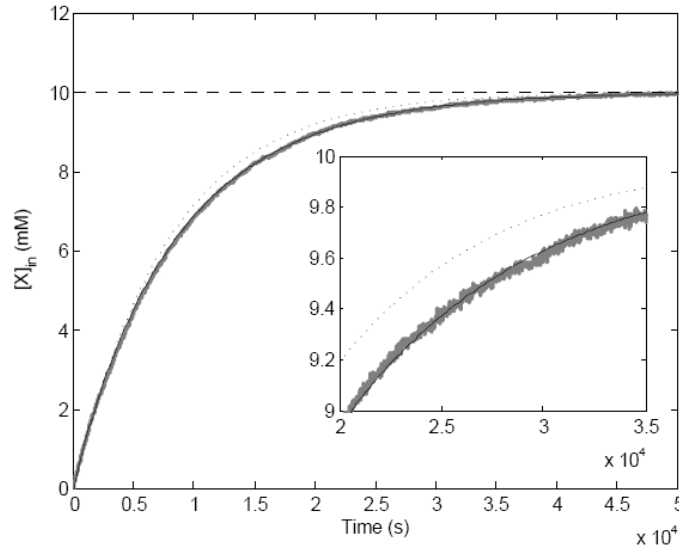


Figura 8.7 Cinética de incorporación de nutriente X al interior acuoso vesicular. Resultados obtenidos al exponer una vesícula inicialmente esférica, de 50 nm de radio, con una membrana compuesta únicamente de lípido l, a un medio acuoso externo rico en nutrientes, donde $[X]_{out} = 10$ mM (constante). En todos los casos $[B]_{out} = 100$ mM y $[B]_{in} = 110$ mM, con objeto de asegurar condiciones iniciales de isoosmolaridad ($\Phi = 1$). X es capaz de difundir a través de la membrana ($D_x = 3.78 \times 10^5$ dm² mol⁻¹ s⁻¹), produciéndose, de acuerdo a su gradiente de concentración, un flujo neto de entrada al medio acuoso intravesicular que explica que la concentración interna de X aumente y termine equilibrándose con la externa. El resultado del análisis determinista (curva en gris) reproduce fielmente la tendencia general obtenida por simulación estocástica (curva en negro), al tener igualmente en cuenta la dinámica del compartimento (Apéndice III), mientras que la solución obtenida por integración de la ecuación de permeabilidad (Ecuación 11.2 de Material y Métodos) (curva punteada) sobreestima ligeramente el curso de $[X]_{in}$, tal como se aprecia en el inserto.

En la Figura 8.8 se presenta, tanto en términos estocásticos como deterministas, cuál ha sido la respuesta dinámica del compartimento al flujo de entrada de X al interior acuoso vesicular. En efecto, a medida que el número de moléculas de X en el interior vesicular aumenta, se produce un incremento del volumen intravesicular (Figura 8.8, abajo en el centro), compensándose así las diferencias de tensión osmótica generadas entre ambos lados de la membrana. Este fenómeno a su vez se acompaña de un aumento del número de moléculas de lípido en el interior acuoso en detrimento de su población en membrana (Figura 8.8, arriba), a fin de mantener la concentración de equilibrio de monómero disuelto en el interior acuoso (condición de equilibrio lipídico con el entorno). Esto significa por otro lado una ligera disminución de la superficie vesicular (Figura 8.8, abajo a la izquierda). Por todo ello, el valor del factor de estabilidad Φ (Figura 8.8, abajo a la derecha) disminuye hasta que logra establecerse definitivamente por completo el equilibrio (tanto de intercambio lipídico como osmótico, de flujo de X).

Con las condiciones de simulación exploradas, la disminución de Φ es claramente insuficiente como para provocar la ruptura de la vesícula por choque osmótico: Φ se estabiliza en torno a 0.94, es decir muy por encima de su valor crítico ($\Phi = 0.79$). En definitiva, puede postularse que el sistema vesicular considerado es, en un medio tamponado, suficientemente robusto para sobrellevar gradientes notables de concentración de solutos, que puedan ser del orden de 10 mM. En este sentido, los nutrientes difusibles a través de membrana que pudieran estar disponibles en condiciones prebióticas (presentes en concentraciones probablemente mucho menores) no habrían de suponer de por sí amenaza alguna para la estabilidad vesicular.

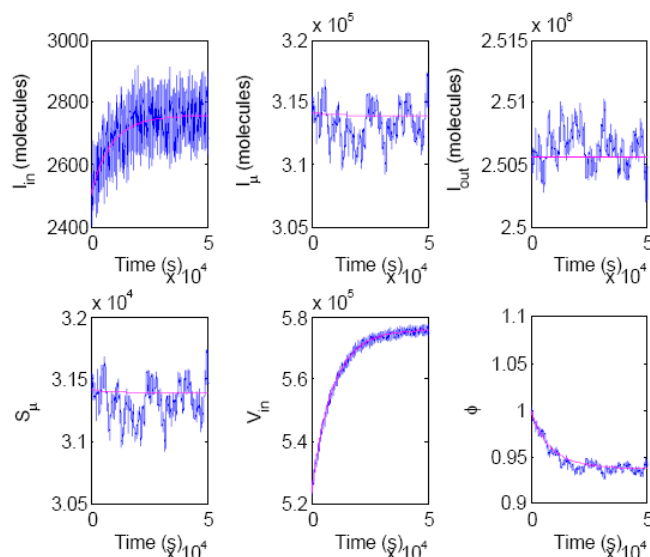


Figura 8.8 Respuesta dinámica de una vesícula de composición pura al influjo del nutriente X. Se exponen los cambios que se producen en el compartimento como consecuencia de la entrada de X en la vesícula bajo las mismas condiciones que en la Figura 8.7. En la primera fila, de izquierda a derecha: evolución temporal del número de moléculas de lípido I disueltas en el medio acuoso externo, ensambladas en membrana, y disueltas en el medio acuoso intravesicular. En la segunda fila, de izquierda a derecha: evolución temporal de la superficie vesicular, del volumen intravesicular, y del factor de estabilidad Φ . En negro: resultado de una simulación estocástica; en gris: resultado del análisis determinista.

Por último, analizada ya la permeabilidad y el proceso de equilibrado con una vesícula formada sólo por lípido I, se ha estudiado la dinámica con vesículas de composición mixta, constituidas por combinaciones binarias de I y L a distintos ratios molares en membrana, con objeto de corroborar que el programa ENVIRONMENT implementa adecuadamente una u otra función de permeabilidad dependiente de composición de membrana (Ecuaciones 8.15 y 8.16). Obviamente, la velocidad de equilibrado ha de estar condicionada por el coeficiente de difusión molecular a través de la membrana. Tal como demuestra la Figura 8.9 para el caso de vesículas con un tamaño inicial de 50 nm de radio, ya se tome por referencia combinaciones de LA/GML (Ecuación 8.15) o de LA/DLPC (Ecuación 8.16), la velocidad de equilibrado varía según la fracción molar de lípidos considerada en membrana. Además se comprueba que las vesículas en las que X se incorpora más rápido son precisamente aquellas con membranas formadas por mezclas intermedias, heterogéneas de lípidos, que en los experimentos *in vitro* presentaban mayores valores de permeabilidad (es decir LA/GML 4:1, LA/GML 2:1 y LA/DLPC 3:1) (ver Figura 6.11). En tales casos el proceso de equilibrado se completa prácticamente en poco más de 30 min. Por tanto, a juzgar por las diferencias en el curso de la concentración de X en el interior vesicular, se ha logrado reproducir el efecto deseado con las funciones de permeabilidad y, en consecuencia, de ahora en adelante podrá simularse de forma realista la permeabilidad en modelos de vesículas mixtas cuya composición lipídica en membrana pueda ir cambiando con el tiempo.

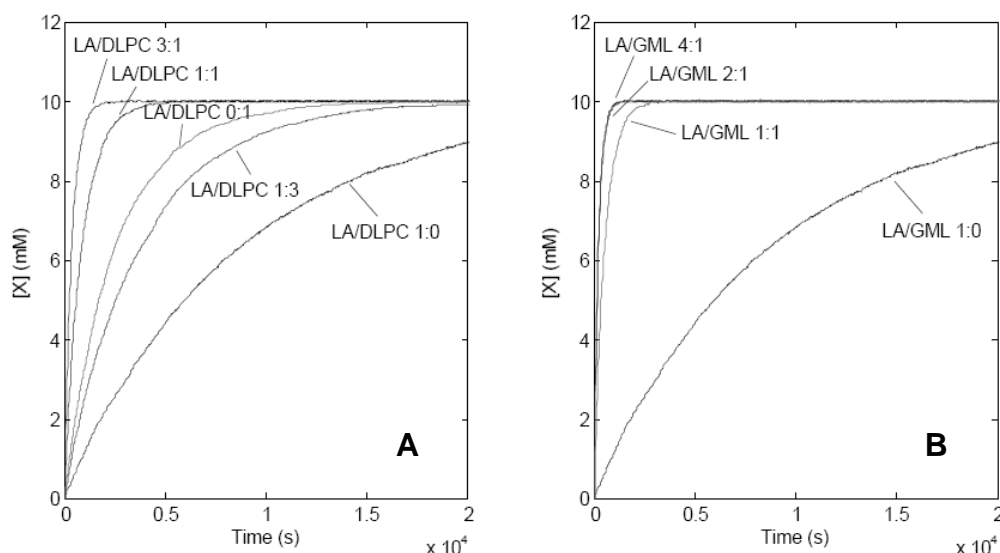


Figura 8.9 Cinética de incorporación de nutriente X en vesículas de distinta composición lipídica. Se muestra la evolución temporal de la concentración de X en el medio acuoso intravesicular obtenida por simulación estocástica con distintos modelos de membrana: vesículas formadas por combinaciones binarias de lípidos en distintas proporciones molares relativas en membrana (indicadas en la figura) – bien constituidas por LA/DLPC (A) o por LA/GML (B). En ambos casos se comprueba la correcta implementación con ENVIRONMENT de la función de permeabilidad dependiente de composición de membrana (ver texto), dado que las diferencias en las velocidades de equilibrio concuerdan (al menos cualitativamente) con las diferencias que presentaba el valor experimental del coeficiente de difusión molecular entre los diversos ratios molares particulares de lípido (Tabla 6.3). En todo caso se ha partido como condición inicial de una vesícula esférica (con radio de 50 nm) en perfecto equilibrio lipídico y en condiciones de isoosmolaridad, siendo inicialmente $[X]_{out} = 10$ mM (constante), $[B]_{out} = 100$ mM, $[X]_{in} = 0$ y $[B]_{in} = 110$ mM.

8.3 Funcionamiento y estabilidad dinámica global del sistema proto celular

Una vez exploradas a través de los modelos preliminares las principales características que ofrece la dinámica del compartimento vesicular, se ha pasado ya sí a estudiar el escenario completo del sistema proto celular, considerando el arquetipo de protometabolismo encapsulado dentro de una vesícula prebiótica modelo con propiedades dinámicas y estructurales realistas. Por el momento, la membrana, en equilibrio lipídico con el entorno, se supondrá formada exclusivamente por un tipo de lípido sencillo l de síntesis abiótica (disponible en condiciones prebióticas). Así pues aparecerá desprovista de lípido L (en ausencia de procesos reactivos que puedan motivar la formación de lípidos de cierta complejidad), concibiéndose por tanto todavía en un estadio muy temprano de su evolución.

8.3.1 Modelo cinético

El modelo proto celular contemplado en este apartado ha surgido esencialmente del esfuerzo por trasladar el modelo protometabólico compartimentado descrito en el capítulo anterior a condiciones lo más realistas posibles. En definitiva, ha resultado fundamentalmente de la fusión de los elementos de aquel modelo con los atributos propios de un compartimento vesicular dinámico (tal como el del Apartado 8.1 o el del Apartado 8.2), capaz de integrar fenómenos como el autoensamblaje reversible de lípidos en membrana y su intercambio con el medio acuoso, la

respuesta volumétrica a la presión osmótica, o la difusión de solutos a través de la membrana lipídica. En cualquier caso, a continuación se resumen los detalles más significativos del modelo cinético, representado esquemáticamente en la Figura 8.10.

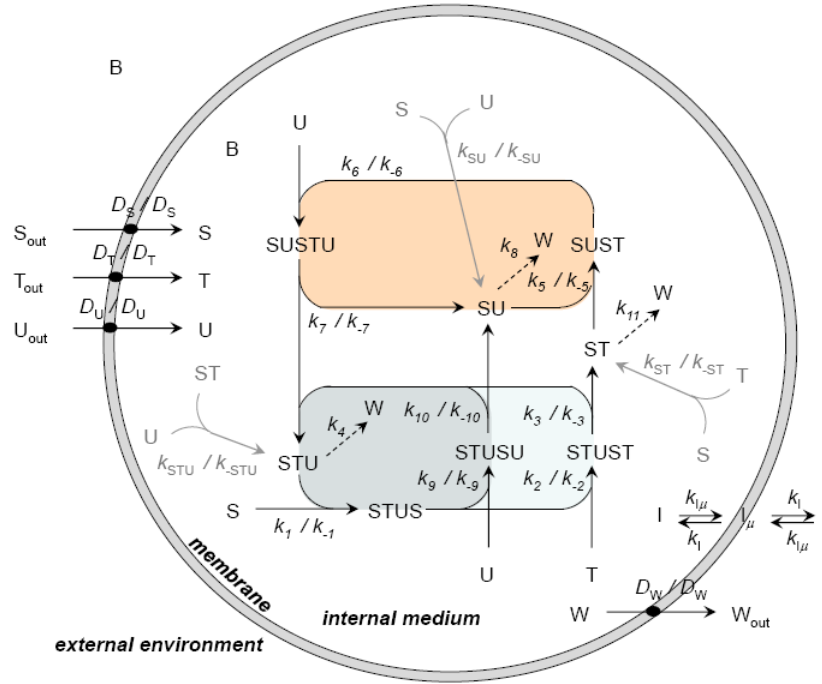


Figura 8.10 Modelo cinético de un sistema protocelular formado por una red protometabólica de reacciones encapsulada en una vesícula prebiótica realista. Se considera un compartimento dinámico limitado por una membrana, la cual está constituida por el ensamblaje reversible de moléculas de un tipo de lípido sencillo l que se postula disponible en condiciones prebióticas. El lípido ensamblado está en equilibrio con su forma monomérica disuelta en el medio acuoso. El medio externo se supone un reservorio ilimitado de nutrientes (S, T y U), compuestos ricos en energía que son capaces de permear a través de la membrana y servir de precursores para la red de reacciones que sucede en el interior acuoso. Se trata de un esquema de reacciones idéntico al del sistema protometabólico modelo contemplado en capítulos precedentes (ver Figuras 5.1 y 7.1), si bien ahora se consideran explícitamente los productos de degradación (por simplicidad referidos como W). La membrana retiene los distintos intermediarios metabólicos mientras que es permeable a W, permitiendo su liberación al medio externo, que actúa como sumidero. El flujo continuo de materia y energía a través del sistema (entrada de S, T y U y salida de W) posibilita que el protometabolismo pueda operar en condiciones fuera del equilibrio, en el sentido marcado por las flechas. B es de nuevo una especie no reactiva que actúa como tampón osmótico, confiriendo estabilidad al compartimento.

La membrana que limita el compartimento protocelular es tratada al igual que en los modelos vesiculares previos, como una bicapa lipídica (cerrada sobre sí misma) en equilibrio dinámico con el medio acuoso. Como ya se ha señalado, se considera de composición pura; está formada por el ensamblaje de moléculas de una única especie de lípido l de relevancia prebiótica, encontrándose ésta en continuo intercambio reversible entre su forma ensamblada en membrana y su forma disuelta en el medio acuoso (tanto intracelular como extracelular). Al lípido l se le han atribuido nuevamente las propiedades físicas moleculares del LA, de modo que los valores de los parámetros referidos a los atributos de la membrana son a todos los efectos equivalentes a los del modelo vesicular del Apartado 8.1.1. Así, $\alpha_l = 0.2 \text{ nm}^2$, $d_l = 1.5 \text{ nm}$, y $\lambda = 3 \text{ nm}$. Y en cuanto a la concentración de equilibrio de monómero disuelto, $[l]_{aq}^{eq} = 7.95 \text{ mM}$. Únicamente se han hecho variar los valores de las constantes cinéticas de incorporación y liberación del lípido de membrana, por motivos prácticos: se demuestra que con valores algo menores a los originales

($k_{\mu}=7.6 \times 10^{16} s^{-1} M^{-1} dm^{-2}$ y $k_f=6.042 \times 10^{-3} s^{-1}$) se reduce bastante el tiempo de cómputo sin alterar en absoluto la dinámica global (a gran escala) del sistema⁸⁷.

Los procesos de reacción permanecen circunscritos en el medio acuoso intracelular, un dominio cuyo volumen V_{in} es variable y está condicionado por el balance osmótico con el medio acuoso externo. Como red interna de transformaciones se ha vuelto a tomar el mismo esquema de reacciones que se viene considerando en capítulos anteriores: un sistema protometabólico modelo que presenta cierre catalítico y es capaz de producir, a partir de precursores ricos en energía (S, T y U), sus propios catalizadores implicados en la red (STU, ST y SU). La principal novedad radica en que ahora, en este modelo, se han considerado explícitamente los productos de las reacciones de degradación de los catalizadores, ya que al tratarse presumiblemente de especies osmóticamente activas, su acumulación en el medio acuoso interno afectará a la dinámica del volumen del compartimento, y con ello potencialmente también a la estabilidad global del sistema. Por simplicidad, todos los productos de las degradaciones han sido designados como una única especie W. En general, a efectos estequiométricos, se ha supuesto que $STU \rightarrow W$, $ST \rightarrow W$ y $SU \rightarrow W$ (Figura 8.10), si bien también se ha considerado puntualmente como alternativa un esquema en el que $STU \rightarrow 3W$, $ST \rightarrow 2W$ y $SU \rightarrow 2W$, que en verdad es más acorde con la idea de que sean las formas energéticamente inactivas de S, T y U (los monómeros s, t y u) los productos finales resultantes de la degradación⁸⁸.

Una vez más, la membrana se supone semipermeable: impermeable a los intermediarios metabólicos (que quedan de este modo retenidos en el medio acuoso intracelular), y permeable en cambio a solutos más pequeños. En el modelo se postula que tanto los precursores ricos en energía (S, T y U) como los productos metabólicos de degradación (W) son capaces de atravesar la membrana por difusión pasiva. A este respecto, se ha considerado como en ocasiones anteriores (Capítulo 7, y más recientemente Apartado 8.2) que los nutrientes presentan propiedades de permeabilidad equivalentes a las de la CF a través de membranas formadas por LA. Es decir, $D_s = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por defecto, un mismo coeficiente de difusión molecular se ha asignado también para W ($D_W = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), salvo cuando se indica lo contrario. En todo caso, nótese que la decisión de expresar la permeabilidad a los diversos solutos en términos del coeficiente de difusión molecular D_x no es arbitraria, sino que viene condicionada por el hecho de considerar variables el tamaño y forma del compartimento protoceular. Las constantes cinéticas de flujo q_k , utilizadas a lo largo del Capítulo 7 como referencia para describir los procesos

⁸⁷ Con los valores originales de k_{μ} y k_f , el flujo de intercambio lipídico resulta un fenómeno muchísimo más probable (mucho más rápido) que cualquiera de los otros procesos cinéticos definidos en el modelo, lo cual ralentiza mucho el tiempo de cómputo necesario para simular la dinámica global. De algún modo la inmensa mayoría del tiempo se consume simulando un constante equilibrado del lípido entre los distintos dominios, algo que ya ha sido estudiado en profundidad con los modelos vesiculares previos y que ahora es en cierto modo relativamente prescindible mientras no sucedan mínimamente reacciones o procesos de transporte que alteren el estado osmótico del sistema. Por tanto se ha resuelto reescalar el valor de los parámetros de intercambio lipídico, aun a costa de sacrificar parte del realismo de la dinámica lipídica: existe un amplio margen de maniobra para tomar valores de k_{μ} y k_f que, siendo menos extremos que los originales, sigan siendo todavía suficientemente altos en comparación con la dinámica del resto de procesos como para asegurar en todo momento el equilibrio del lípido y asegurar una dinámica global del sistema semejante. En todo caso, obviamente, se han ajustado de modo que la concentración de equilibrio del lípido disuelto siga siendo la misma.

⁸⁸ En cualquier caso, la decisión por una u otra estequiometría no supone grandes diferencias en el comportamiento global del sistema. Con ambos esquemas se obtienen resultados cualitativamente semejantes, por lo que no se hará demasiado hincapié en este aspecto. Sí existirán en cambio otros factores que serán más determinantes y a los cuales se prestará mayor atención en las simulaciones.

de transporte a través de membrana, ya no toman valores fijos, por lo que es conveniente escoger como descriptores parámetros independientes de la geometría del compartimento, como los valores de D_x , que son los que ahora se usan para calcular los flujos transmembrana (ver Material y Métodos).

El medio acuoso externo, mucho más amplio que el medio intracelular, al tiempo que se considera nuevamente como una fuente inagotable de nutrientes, donde la concentración de los precursores ricos en energía es – bajo una hipótesis de sopa primitiva – constante ($[S]_{\text{out}} = 0.4$ mM, $[T]_{\text{out}} = 0.2$ mM y $[U]_{\text{out}} = 0.1$ mM), se considera a su vez un sumidero de los productos inactivos de degradación W. Así, por aproximación $[W]_{\text{out}}$ se supone en todo momento igual a cero. Estas dos restricciones externas aseguran un flujo continuo de materia y energía a través del sistema protoceular, requisito indispensable para que éste pueda operar en condiciones fuera del equilibrio, como ya se apuntó en el Apartado 7.1. Por ello se explica que, a pesar de las reversibilidades (todos los procesos son reversibles salvo las reacciones de degradación de catalizadores), el sistema en su globalidad funcione preferencialmente en el sentido marcado por las flechas en el esquema de la Figura 8.10, es decir adquiriendo continuamente precursores ricos en energía y liberando productos de degradación inactivos.

En el medio acuoso intracelular todas las especies se consideran de concentración variable, incluidas S, T, U y W. Y en lo que se refiere a las constantes cinéticas de reacción, se conservan iguales que en los modelos de los capítulos previos, con los valores señalados en la Tabla 5.1. Una vez más las concentraciones se expresan en mM, y el tiempo de los procesos de reacción en unidades arbitrarias τ , con objeto precisamente de volver a analizar la influencia de la escala temporal del protometabolismo sobre el funcionamiento y viabilidad del sistema en este nuevo escenario protoceular más elaborado.

Por último, debe señalarse que para poder estudiar el sistema en condiciones de cierta robustez, en el modelo se ha añadido la especie B, un compuesto hidrofílico impermeable y no reactivo que actúa como tampón osmótico, proporcionando mayor estabilidad al compartimento ante las continuas fluctuaciones aleatorias que se producen en los procesos de intercambio lipídico. Todas las simulaciones se han realizado partiendo como condición inicial de una protocélula esférica de 50 nm de radio (es decir, con 314159 moléculas de l en membrana) en perfecto equilibrio lipídico con su entorno ($[l]_{\text{out}} = [l]_{\text{in}} = 7.95$ mM) y en condiciones de isoosmolaridad. De esta manera, mientras que $[B]_{\text{out}} = 100$ mM (constante), $[B]_{\text{in}}$ se ha ajustado de tal forma que su valor inicial compense las diferencias de concentración con el medio externo teniendo en cuenta la concentración inicial de todos los metabolitos en el interior protoceular. Sólo así se puede asegurar siempre como condición inicial que $\Phi = 1$.

8.3.2 Dinámica estocástica y condiciones de viabilidad

Llegados a este punto, estamos ya sí en disposición de poder explorar de manera sistémica los límites a la estabilidad dinámica global del sistema protoceular. La cuestión fundamental que se ha planteado en las simulaciones con este modelo ha sido la de esclarecer qué restricciones surgen como consecuencia de la interacción recíproca entre el metabolismo y el compartimento lipídico (o membrana). Es decir, determinar en qué medida la dinámica y propiedades de uno condicionan y comprometen el funcionamiento del otro, que no es sino el eslabón clave para completar el entendimiento de las condiciones de viabilidad del sistema en su conjunto.

Inspirados por el modo de proceder del capítulo anterior, la estrategia de análisis ha consistido en primer término en variar la escala temporal de los procesos protometabólicos

internos y evaluar su repercusión sobre la dinámica global del sistema (ahora ya no sólo sobre la capacidad de mantenimiento de los metabolitos en un estado operativo, sino sobre la propia estabilidad del compartimento como tal). La Figura 8.11 muestra los resultados tanto deterministas como de simulación estocástica obtenidos para varios casos de sistemas protoelulares que difieren en la escala de tiempo general de los procesos internos de reacción (incluyendo tanto reacciones de interconversión como de degradación). En todos ellos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$ y se ha tomado como condición inicial de metabolitos las concentraciones propias del estado estacionario determinista funcional hallado para condiciones de difusión no limitante de precursores, o lo que es lo mismo, para el protometabolismo libre en solución (Apartado 5.2).

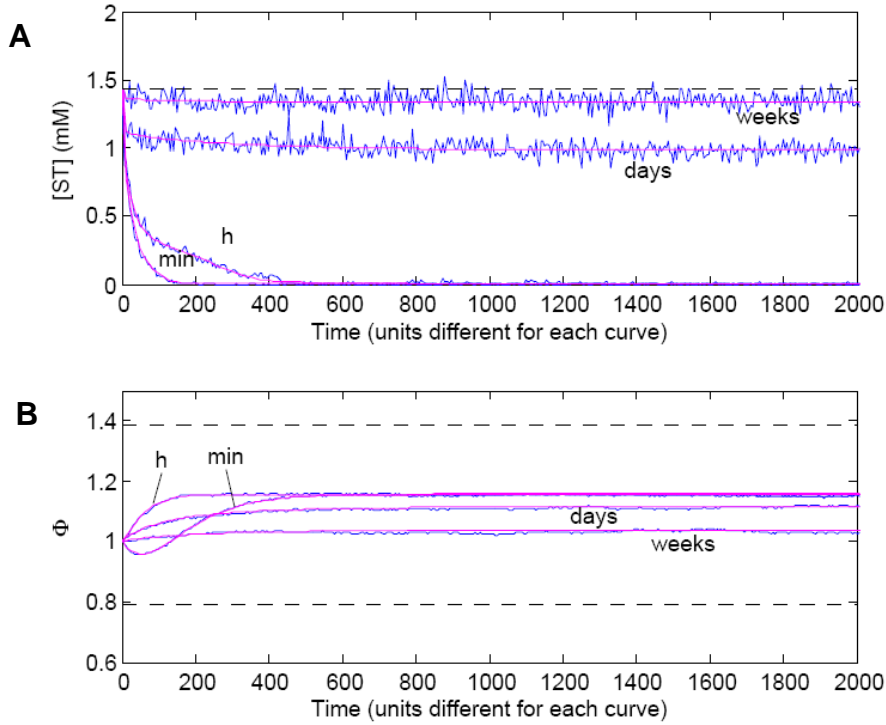


Figura 8.11 Comportamiento dinámico protoelular obtenido con diversas escalas temporales de los procesos protometabólicos internos. Los distintos experimentos difieren entre sí tan sólo en las unidades de tiempo asignadas a las constantes cinéticas de reacción, tomando en cada caso todas las constantes de reacción unidades consistentes con la escala temporal especificada en la figura. El resto de parámetros son fijos en todos los experimentos. (A) La estabilidad global protoelular queda supeditada a la capacidad de mantenimiento de concentraciones internas de metabolitos operativas. La difusión limitada de solutos a través de la bicapa de membrana ($D_s = D_r = D_v = D_w = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es responsable en última instancia de que en aquellos casos en los que el curso general de las reacciones es más rápida, el protometabolismo colapse. (B) La estabilidad del compartimento lipídico no se ve en cambio comprometida: el factor de estabilidad Φ se mantiene en todo caso dentro de los márgenes permitidos, alejado de los límites críticos (B, líneas discontinuas). En gris: resultados de simulación estocástica; en negro: resultados deterministas. Las unidades en el eje de abscisas permanecen indefinidas, ya que vienen determinadas por cada escala de tiempo particular considerada. En todos los casos $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \tau^{-1}$.

Como era de esperar, en lo que se refiere al funcionamiento metabólico (Figura 8.11A) el efecto es semejante al que se observaba con el modelo del capítulo anterior (Figura 7.4): Cuando la escala de tiempo considerada es demasiado corta (reacciones muy rápidas), la velocidad de adquisición de los precursores ricos en energía a través de la membrana es insuficiente como para compensar la rápida velocidad de degradación de los catalizadores, por lo que las poblaciones de los distintos metabolitos caen rápidamente a valores residuales muy próximos a la extinción. Sólo

cuando las reacciones suceden a escalas de tiempo relativamente largas el protometabolismo logra mantener concentraciones funcionales de sus metabolitos y prospera. Entonces la incorporación de los precursores sí llega a dar soporte a una demanda interna que es mucho menos exigente. Así pues, de nuevo se confirma que la difusión limitada de nutrientes a través de la bicapa acota el rango posible de velocidades de operación permisibles para las reacciones internas.

Algo en lo que los resultados de la Figura 8.11A no concuerdan con los de la Figura 7.4, y que podría ser objeto de debate, es precisamente la escala de tiempo general mínima compatible con el automantenimiento del protometabolismo encapsulado. Siendo como en ambos casos se suponen iguales condiciones metabólicas ($k_i = k_s = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$) y unas propiedades de permeabilidad del compartimento equivalentes a aquellas determinadas experimentalmente para las vesículas de LA con CF, sorprende que aquí se obtenga una escala de tiempo crítica de días mientras que en los experimentos de la Figura 7.4 resultaba una escala de tiempo crítica de semanas. No obstante, la explicación es sencilla y radica únicamente en el hecho de haber considerado en el modelo actual un compartimento de 50 nm de radio, en lugar de uno de 200 nm de radio, que es el tamaño que corresponde a las vesículas de LA analizadas *in vitro* (e implícitamente también al compartimento del modelo del Capítulo 7, por el hecho de utilizar el valor experimental de la constante cinética de flujo q_x). El parámetro q_x es sensible al tamaño vesicular, por lo que siendo el radio de 50 nm, ya no puede admitirse que $q_s = q_T = q_U = 3.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Tomándose en este caso por referencia el valor del coeficiente de difusión molecular D_x , que sí se conserva invariable con el tamaño ($D_s = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), es posible recalcular q_x para las nuevas condiciones ($r = 50 \text{ nm}$): resulta $q_s = q_T = q_U = 1.26 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A partir de aquí, la escala temporal mínima puede ser deducida siguiendo razonamientos semejantes a los utilizados entonces (Apartado 7.3). El punto crítico para preservar un estado estacionario funcional de concentraciones de metabolitos con $k_i = k_s = k_{11} = 0.3 \text{ } \tau^{-1}$ es $q_c = 8.71 \text{ } \tau^{-1}$, por lo que se requiere que la escala de tiempo general de las reacciones protometabólicas abarque al menos $8.71 / (1.26 \times 10^{-4})$ segundos, es decir $6.93 \times 10^4 \text{ s}$. Y precisamente es la escala de tiempo de días la escala más corta capaz de cumplir esto ($1 \text{ día} = 8.64 \times 10^4 \text{ s}$). En tal caso $q_c = 8.71 \text{ día}^{-1} = 1.01 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, confirmándose que $q_s = q_T = q_U > q_c$. En consecuencia, en el modelo cinético las constantes de reacción de primer orden, tales como k_7 , han de tomar al menos unidades del orden de día^{-1} , y las de segundo orden, tales como k_1 , unidades de $\text{mM}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para poder concebir el funcionamiento del protometabolismo dentro del compartimento especificado.

¿Qué sucede en cuanto a la estabilidad dinámica del compartimento? ¿Qué repercusiones plantea la escala temporal de los procesos protometabólicos? Lo cierto es que bajo las condiciones de los parámetros exploradas, ninguna de las escalas de tiempo consideradas supone una amenaza para la integridad del compartimento (Figura 8.11B); éste permanece estable durante todo el tiempo de estudio, sin sufrir ruptura o división de la membrana. En cualquier caso sí se observa una cierta tendencia del compartimento protoceular a adoptar geometrías ovaladas, es decir formas relativamente relajadas, con un factor de estabilidad $\Phi > 1$. Este efecto se entiende bien una vez que se ha reparado en que las concentraciones internas de metabolitos, que parten inicialmente de valores ideales propios de un protometabolismo no encapsulado, sufren irremediablemente – aun en el mejor de los casos – una disminución con el tiempo como consecuencia de la accesibilidad limitada de los precursores a través de la membrana (Figura 8.11A). La reducción de la tensión osmótica en el interior acuoso conlleva una disminución del volumen del compartimento sin que mengüe la superficie de membrana, y por ello un aumento del valor del parámetro Φ .

El incremento de Φ es tanto mayor cuanto más disminuyen las concentraciones, como denota la Figura 8.11B. Sin embargo, ni siquiera en el caso extremo de las escalas temporales más cortas que conducen rápidamente a un estado residual de los metabolitos se llega a comprometer la estabilidad del compartimento: Φ se estabiliza en torno a 1.16, un valor todavía muy lejano del valor crítico precisado para la división ($\Phi = 1.386$). Esto explica porqué el colapso del protometabolismo no llega a provocar la desestabilización de la membrana. Así, si en su momento se postulaba que el compartimento lipídico podía sobrellevar gradientes notables de concentración de solutos (Apartado 8.2.2), ahora la lectura es que resulta lo suficientemente robusto a las variaciones producidas en las concentraciones de los metabolitos internos como para poder resistir inclusive la pérdida completa del protometabolismo (por supuesto, en un medio tamponado como el que aquí se considera)⁸⁹.

En suma, los resultados expuestos hasta el momento sugieren que el principal condicionante para el funcionamiento y desarrollo del sistema protoceular no es sino el de lograr mantener el protometabolismo interno operativo, es decir con concentraciones relativamente altas de metabolitos. En verdad, debe matizarse que sólo se ha explorado un estrecho rango del espacio de parámetros (sólo se ha estudiado el efecto de variar la escala de tiempo en que se expresan las constantes cinéticas de reacción). Sin embargo, sí puede afirmarse que la viabilidad protoceular queda *al menos* supeditada a que el curso general de los procesos internos de reacción (la velocidad de las transformaciones) sea adecuado a la velocidad característica de incorporación de los precursores a través de la membrana. En este sentido se considera una restricción impuesta por las propiedades de la membrana sobre el metabolismo. ¿Significa esto que el metabolismo no pueda por su parte ejercer limitaciones severas sobre la estabilidad dinámica del compartimento? Hasta ahora el efecto de la actividad protometabólica sobre la estabilidad del compartimento ha sido con mucho subcrítico, si bien se ha tomado el supuesto de que los productos de degradación W atraviesan la membrana con la misma facilidad con la que lo hacen los nutrientes (es decir, $D_W = D_S = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). ¿Pero qué ocurre si se considera para W un coeficiente de difusión molecular distinto?

La estrategia que se ha seguido a continuación ha sido la de analizar el efecto de variar el valor del parámetro D_W , manteniendo en cambio fija la escala de tiempo de los procesos internos de reacción. La Figura 8.12 resume el comportamiento protoceular obtenido con tres valores distintos de D_W . En los tres casos que se exponen se ha considerado el protometabolismo operando a una escala temporal de días, con objeto de garantizar su automantenimiento en las condiciones establecidas de difusión de los precursores ($D_S = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (se supone $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ día}^{-1}$). Por otro lado, como condición inicial de metabolitos internos se han establecido concentraciones lo más próximas posible a las del estado estacionario determinista funcional hallado para esas mismas limitaciones de acceso de nutrientes, salvo para W ($[W]_{t=0} = 0$). Esto evita tener que contemplar la perturbación inicial de Φ en respuesta al equilibrado general de las concentraciones (Figura 8.11B), y permite centrar la atención exclusivamente en el efecto osmótico provocado por la acumulación interna de W.

Aunque en los tres sistemas protoceulares considerados en la Figura 8.12 la actividad protometabólica es similar (todos ellos comparten la misma velocidad de producción de W), curiosamente la evolución temporal de la concentración de W en el interior del compartimento resulta muy distinta según la permeabilidad de membrana a dicho compuesto. Conforme menor es

⁸⁹ Esto es interesante por otra parte, ya que también apunta hipotéticamente hacia una relativa versatilidad de este tipo de membrana para encapsular otros posibles esquemas protometabólicos que pudieran presentar dinámicas de metabolitos cambiantes o fluctuantes (por ejemplo, aquellos propuestos por Gánti (Gánti, 2002)).

el valor de D_W , más limitada es la velocidad de liberación de W al entorno y por tanto más cantidad de W se acumula en el medio interno protoelular. A su vez, la respuesta del compartimento es clara: el volumen del interior acuoso aumenta para compensar la tensión osmótica generada, lo que supone una disminución del factor de estabilidad Φ tanto mayor cuanto más se acumula W (Figura 8.12, inserto). De esta manera, si la permeabilidad a W resulta demasiado baja con respecto a su producción interna, la acumulación en el medio interno se vuelve excesiva y provoca inevitablemente la ruptura del compartimento por crisis osmótica ($\Phi < 0.79$). Esto es lo que sucede por ejemplo para $D_W = 2.63 \times 10^2 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 8.12, caso iii.).

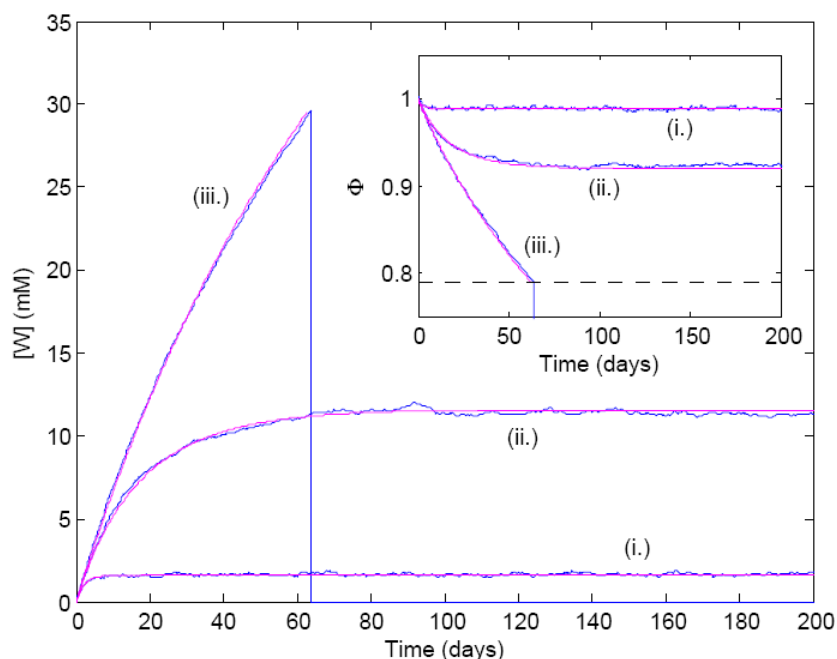


Figura 8.12 Efecto de la acumulación en el medio acuoso interno del compuesto W sobre la estabilidad global protoelular. El protometabolismo genera continuamente productos de degradación W cuya acumulación en el interior del compartimento se compensa de un modo más o menos efectivo según la permeabilidad de membrana a este compuesto. Se muestran los resultados obtenidos con tres valores distintos de D_W : $1.57 \times 10^4 \text{ dm}^2/(\text{mol s})$ (i.), $2.31 \times 10^3 \text{ dm}^2/(\text{mol s})$ (ii.), y $2.63 \times 10^2 \text{ dm}^2/(\text{mol s})$ (iii.). Si la velocidad de liberación de W es muy escasa con relación a su producción (caso iii.), la concentración de W en el interior acuoso crece excesivamente y termina provocando la ruptura del compartimento protoelular por crisis osmótica. Este fenómeno se explica en respuesta a la tensión osmótica generada: el compartimento responde hinchándose, y por tanto disminuye el factor de estabilidad Φ , hasta que en último término se atraviesa el umbral de estabilidad ($\Phi < 0.79$) (ver inserto). Los resultados de los análisis estocásticos se muestran en gris; en negro los de los análisis deterministas. En todo caso $D_S = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Todos los experimentos se han realizado con una protocélula en la que el protometabolismo opera a una escala temporal de días (asegurando así su mantenimiento) y partiendo de concentraciones de metabolitos propias del estado estacionario funcional hallado para esas mismas condiciones de velocidad de las reacciones.

En definitiva, los resultados indican que la estabilidad dinámica global protoelular no está ya sólo condicionada por las limitaciones que impone de manera pasiva la membrana (como limitante del volumen interno de reacción y barrera que es para la libre difusión de nutrientes) sobre la capacidad operativa del protometabolismo subyacente; también lo está por el impacto osmótico que genera la propia actividad metabólica sobre la estabilidad dinámica del compartimento. Tanto la accesibilidad limitada de los precursores (S, T y U) a través de la bicapa, como la acumulación de los productos metabólicos de degradación (W) en el interior protoelular, son factores críticos a tener en cuenta para la viabilidad del sistema en su conjunto.

En este aspecto, se corrobora más si cabe la importancia de abordar la cuestión general de la estabilidad desde un nivel de descripción del sistema que incluya la dinámica del compartimento. Para poder contemplar el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema protoceular en su conjunto (dinámica del protometabolismo-membrana), se precisa una adecuada relación entre la velocidad de incorporación de los nutrientes y el curso general de las reacciones protometabólicas, pero también una adecuada sintonía entre la actividad metabólica y la velocidad de liberación de los productos metabólicos de desecho. En cualquier caso, el sistema propuesto en la Figura 8.10, en tanto que es capaz de superar estas limitaciones y mantenerse funcional en un régimen de automantenimiento robusto con un rango relativamente amplio de valores de permeabilidad de membrana y escalas de tiempo de los procesos internos de reacción, puede ser considerado como un modelo factible de organización protoceular.

8.4 Transición hacia una protocélula plenamente autoprodutiva y con potencial reproductivo

El modelo desarrollado en el Capítulo anterior ha permitido identificar restricciones físico-químicas importantes que podrían haber surgido ligadas al fenómeno temprano de encapsulación, poniendo de manifiesto cómo el sólo hecho del desarrollo del incipiente protometabolismo dentro de un compartimento prebiótico habría supuesto ya un cierto grado de interdependencia entre el protometabolismo y la membrana. Por todo ello se ha resuelto hablar de una organización protoceular. Sin embargo, hasta cierto punto el nivel de interacción entre el protometabolismo y la membrana en dicho modelo es todavía muy débil. Debe reconocerse que éste se ha planteado para fases muy precoces del desarrollo protoceular, y quedará entonces circunscrito a ellas: se ha considerado un escenario en el cual el compartimento aún consiste en una membrana preformada por el autoensamblaje espontáneo de compuestos anfifílicos disponibles en el entorno prebiótico, una estructura que por tanto, por su origen, es ajena a la dinámica protometabólica. En términos organizativos, el compartimento aún permanece causalmente independiente del sistema protometabólico autoorganizado subyacente. No es así extraño que en este estadio inicial de desarrollo la membrana se perciba, y de hecho actúe, más como un limitante externo que como un componente esencial en la organización y el funcionamiento del sistema.

No obstante, tarde o temprano el compartimento protoceular debió haber quedado realmente acoplado de forma explícita e intrínseca con la red protometabólica interna (por ejemplo, por medio de una reacción interna que produjera algún tipo de componente de membrana), pasando de este modo a formar parte, en sentido estricto, de la organización del sistema. Esta nueva relación funcional es ciertamente relevante desde un punto de vista conceptual, ya que permite concebir un nivel de organización protoceular mayor, que involucre no sólo un cierre en cuanto a la producción de las causas eficientes (o catalizadores) de la propia red de reacciones protometabólicas, sino además un cierre “estructural”, un control *desde dentro* del límite físico que delimita el espacio y condiciones de acción de las reacciones, tal como reivindican algunas teorías básicas de la vida (Varela et al., 1974; Gánti, 1975) (ver Introducción). No debe escaparse el hecho de que la membrana, en la medida en que sea producida y modificada activamente por el propio sistema (“metabolizada”), será crucial para completar la individualización y conseguir a la postre un adecuado control interno sobre el conjunto de procesos protoceulares. Así pues, la consecución de un cierre estructural de este tipo (que poco tiene que ver con el evento original de encapsulación), marca una transición importante entre las primeras organizaciones (como las que se han estudiado hasta ahora), con vesículas autoensambladas, y

propriadamente protocélulas maduras, sistemas compartimentados plenamente autoprodutivos (Ruiz-Mirazo et al., 2011)⁹⁰.

Al mismo tiempo, la autoproducción de la membrana resulta un fenómeno interesante desde el punto de vista fenomenológico, ya que hubo de dar presumiblemente pie a nuevos y sugestivos comportamientos dinámicos protoceulares. Basta señalar que la membrana, que hasta el momento en el modelo ha permanecido como una estructura en equilibrio con el entorno, podrá en tal caso apartarse de las condiciones de equilibrio y permitir desarrollar un rango de comportamientos biológicamente más relevantes (ver Apartado 9.3 de la Discusión). Hasta ahora se ha tratado exclusivamente de condiciones de automantenimiento, pero no se ha contemplado por ejemplo la posibilidad de alcanzar condiciones de reproducción. Por otra parte, si se diera la síntesis de un lípido distinto al original se provocaría una conversión de la membrana, con lo que cambiarían sus propiedades y se abriría un abanico de posibilidades todavía mayor. Por todo lo anterior, merece la pena introducir en el modelo de la Figura 8.10 algún tipo de proceso de producción de lípidos y explorar en esta sección, aunque sea de forma muy preliminar, las posibilidades que puede ofrecer este interesante escenario.

En primer lugar se ha analizado el caso más elemental, aquel en el cual el autoensamblaje reversible del lípido *l* en membrana está acoplado con una reacción irreversible de producción de *l* en el interior protoceular. Por sencillez, se ha considerado un esquema cinético idéntico al de la Figura 8.10 y tan sólo se ha sustituido la reacción r_{11} ($ST \rightarrow W$) por el proceso $ST \rightarrow l$, conservando la misma constante cinética k_{11} . Con este cambio no se pretende tanto incidir en detalles químicos de cómo el lípido se originaría químicamente como producto de *ST* y en lugar de *W* (es evidente que tal transformación podría pecar de poco realista), sino más bien se desea lograr cómodamente condiciones de síntesis interna continuada de lípido alterando lo mínimo posible el funcionamiento de la red protometabólica, con objeto de aunar los esfuerzos en caracterizar el comportamiento fenomenológico protoceular (a gran escala). Dicho esto, la transformación $ST \rightarrow l$ bien podría ser una manera simplificada de expresar cinéticamente que la síntesis del lípido ocurre de algún modo en virtud de la presencia del metabolito *ST*, aunque no necesariamente a partir de él⁹¹. Por otra parte, al introducir esta transformación, la cinética seguirá dando cuenta al mismo tiempo del proceso de degradación irreversible de *ST* – otra cuestión es que dejará de contemplarse expresamente la correspondiente producción de cierta cantidad de *W* (cuya estequiometría ya se ha señalado anteriormente que tampoco modifica sustancialmente el comportamiento global del sistema). En estas condiciones, la Figura 8.13 ilustra resumidamente cuáles son los principales rasgos de la dinámica protoceular.

⁹⁰ Esta distinción, aquí considerada de gran relevancia, tan sólo queda latente en otras contribuciones, como por ejemplo (Szostak et al., 2001; Chen y Walde, 2010).

⁹¹ Sería razonable por ejemplo que *ST* actuara realmente como catalizador de la síntesis de *l*. En tal caso podría imaginarse un nuevo ciclo de catálisis que involucrara un precursor lipídico *pre-l* disponible en el entorno que habría de incorporarse al interior protoceular para dar lugar a *l* con la intervención de *ST*. Según una cinética de acción de masas, se deduciría entonces que $d[l]/dt = k_{\text{síntesis}}[pre-l][ST]$. Ahora bien, bajo el supuesto de una concentración de *pre-l* constante (estacionaria) en el interior protoceular, esta expresión podría reducirse a esta otra: $d[l]/dt = k_{11}[ST]$, donde el valor de $[pre-l]$ quedaría englobado en la nueva constante cinética k_{11} , de dimensión tiempo⁻¹. A fin de cuentas, la lectura cinética sería pues idéntica a aquella que correspondería a la transformación incluida en el modelo.

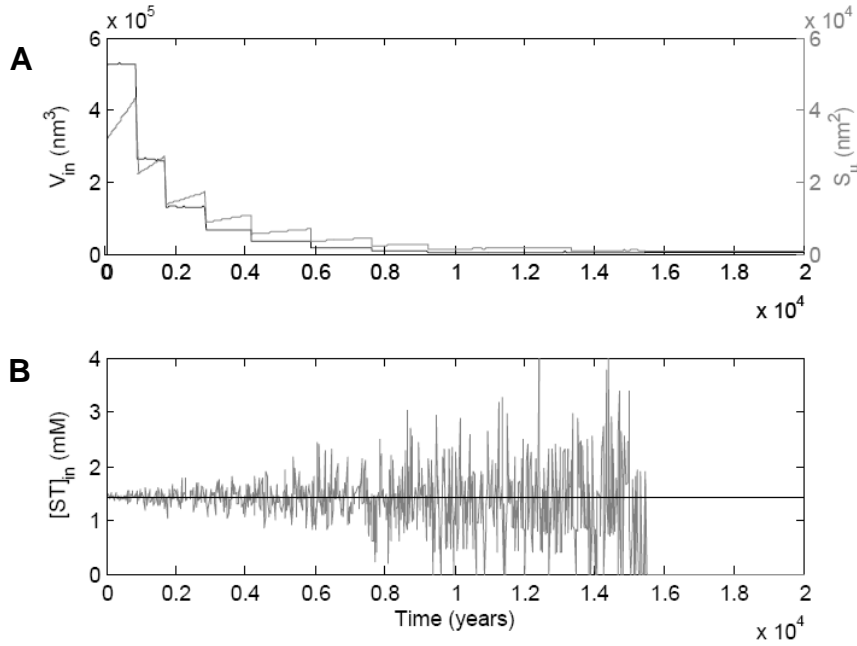


Figura 8.13 Comportamiento dinámico obtenido con un sistema protoelular productor de lípido pero en el que no hay acumulación interna neta de metabolitos. Se ha considerado el modelo protoelular de la Figura 8.10, salvo porque en lugar de la reacción $ST \rightarrow W$ se ha supuesto $ST \rightarrow l$, conservando la misma constante cinética k_{11} . (A) Evolución temporal del volumen intracelular V_{in} y de la superficie de membrana protoelular S_{μ} . S_{μ} crece gracias a la síntesis interna del lípido l , que se incorpora rápidamente en membrana, pero al no existir causa alguna para un incremento continuado del volumen intracelular, se suceden ciclos de división con una progresiva reducción del tamaño protoelular. Las concentraciones internas de los metabolitos, que inicialmente comienzan con valores propios del estado estacionario determinista funcional, sufren fluctuaciones cada vez mayores (con la disminución del volumen) que terminan por causar el colapso de las especies metabólicas. Como ejemplo, se muestra el caso de la evolución temporal de la concentración interna del metabolito ST (B). En gris: resultados de simulación estocástica; en negro: resultados deterministas. Para los procesos protometabólicos internos se ha escogido una escala temporal general de años, como refleja la unidad de tiempo en el eje de abscisas. $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ año}^{-1}$ y $D_8 = D_r = D_u = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El resto de parámetros se conservan invariables, con los valores fijos asignados en apartados anteriores.

El protometabolismo interno, al poder mantenerse operativo en un estado funcional con concentraciones de intermediarios relativamente altas (recordar condiciones en la Figura 8.11A), es capaz de producir constantemente moléculas de lípido l , las cuales son por su hidrofobicidad rápidamente absorbidas por la bicapa de membrana, explicándose así un continuo aumento de la superficie de la membrana protoelular S_{μ} con el tiempo (Figura 8.13A, curva en gris). En cambio, el volumen del interior acuoso V_{in} permanece prácticamente constante por su parte (Figura 8.13A, curva en negro); únicamente aumenta muy levemente al comienzo, en respuesta a la acumulación transitoria de W , que en todo caso termina por ser liberado al medio extracelular, alcanzando una concentración estacionaria en el medio interno (recordar Figura 8.12). Así, el balance global es que el sistema protoelular, inducido por los cambios en la relación superficie-volumen, entra en un régimen reproductivo que se perpetúa en el tiempo, pero en el cual el aumento en la población de protocélulas se acompaña de una progresiva reducción del tamaño protoelular, al igual que sucedía en los experimentos con vesículas lipídicas por adición externa de lípido (ver de nuevo Apartado 8.1.2). En la Figura 8.13A se comprueba efectivamente cómo los picos de sierra correspondientes al volumen y a la superficie protoelular van haciéndose con cada división cada vez más pequeños.

La disminución progresiva del tamaño protoceular constituye una grave amenaza para la estabilidad del sistema, ya no sólo porque las altas fluctuaciones en la dinámica de intercambio lipídico asociadas a pequeños volúmenes terminan provocando la ruptura del compartimento por crisis osmótica a tiempos relativamente cortos, sino porque además el propio protometabolismo también es susceptible de colapsar inducido por el ruido en los procesos de reacción. En el caso considerado en la Figura 8.13 ha sido posible dilatar la estabilidad osmótica del compartimento al menos por el tiempo de estudio, gracias a la alta concentración inicial fijada para el tampón ($[B]_{\text{out}} = 100 \text{ mM}$). Sin embargo, el desmantelamiento del protometabolismo interno ha sido inevitable (Figura 8.13B): a medida que se suceden las divisiones, las fluctuaciones en las concentraciones de los metabolitos van aumentando progresivamente, hasta que llegado un cierto momento (15500 años en las condiciones de la figura) suponen un escape del estado funcional (de concentraciones relativamente altas) al estado residual, con la consiguiente pérdida de las especies de intermediarios. En definitiva, parece claro que mientras no exista un mecanismo de crecimiento neto del volumen intracelular, el régimen reproductivo ocurre con pérdida continua de tamaño y es incompatible con la viabilidad protoceular. Aunque aumente inicialmente el número total de protocélulas, el linaje acaba bien extinguiéndose o volviéndose disfuncional. La cuestión ahora es determinar en qué condiciones puede favorecerse un aumento continuado del volumen y si es posible en tales circunstancias una reproducción sostenida, es decir un régimen en el que cada protocélula se replique indefinidamente sin comprometer la estabilidad y capacidad reproductiva de las sucesivas generaciones de protocélulas hijas⁹².

Como primera medida, se ha procedido a variar la permeabilidad de la bicapa a los productos de degradación W disminuyendo el valor del parámetro D_W . Esto permite prolongar la fase inicial de acumulación de W en el interior protoceular y promover por tanto temporalmente el crecimiento del volumen intracelular (por la tensión osmótica generada, de modo semejante a como sucedía en la Figura 8.12). Sin embargo, a largo plazo, cuando no se desencadena un choque osmótico prematuro, se termina igualando la producción de W con su liberación al medio externo y cesa el aumento del volumen. En consecuencia, se acaba de nuevo inevitablemente en un régimen de divisiones con pérdida de tamaño celular. Resulta por ello de momento (con los resultados disponibles hasta la fecha) un mecanismo ineficaz. Como alternativa, se ha ideado un modelo cinético en el cual uno de los varios subproductos no reactivos que se generan como consecuencia de la actividad protometabólica, que denominaremos Z, se supone totalmente impermeable. Concretamente, se ha supuesto que la reacción r8 ($SU \rightarrow W$) rinde Z en lugar de W, manteniendo por lo demás el mismo esquema cinético de procesos que se viene considerando⁹³. Éste constituye el primer modelo con el que ya sí ha sido posible un aumento continuado del volumen protoceular y un régimen de reproducción sostenida, como se ilustra en la Figura 8.14 y se describe en adelante.

El producto Z se acumula indefinidamente en el medio acuoso interno, motivando ahora sí un continuo crecimiento del volumen intracelular (Figura 8.14A, en negro), que debe responder constantemente hinchándose (adquiriendo agua desde el medio externo) para poder compensar la tensión osmótica generada en su interior y recuperar la condición de isotonicidad. Al mismo tiempo, la superficie de membrana (Figura 8.14A, en gris) sigue aumentando gracias a la producción interna de lípido. La tendencia de crecimiento resulta muy similar (en términos relativos) en el caso de la superficie que en el del volumen, por lo que por una parte se previene

⁹² En este aspecto, el reciente estudio teórico realizado por Mavelli y Ruiz-Mirazo (2013) ha servido de guía para buscar condiciones de reproducción óptimas.

⁹³ De nuevo se ha preferido ahorrar en detalles moleculares y sacrificar algo el realismo del esquema de reacciones en pro de un mejor entendimiento del comportamiento global de los procesos.

una crisis osmótica y por otra se explica que el parámetro Φ (Figura 8.14B, curva en negro) se incremente y alcance la condición de división ($\Phi = 1.386$) una y otra vez sin que las sucesivas generaciones de protocélulas sufran una disminución progresiva de tamaño (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2013). En la figura no se muestran los resultados de toda la descendencia sino sólo el curso temporal (con cada generación) de las variables geométricas de una sola protocélula proveniente de la célula madre. Sin embargo, es suficiente para corroborar que la reproducción es eficiente y se efectúa sin que merme la estabilidad y capacidad funcional en el linaje⁹⁴. Al representar la evolución temporal del número total de protocélulas (Figura 8.14B, en gris), se observa que la población crece de manera exponencial: a lo largo del tiempo de simulación se han sucedido 20 generaciones, registrándose así al final un total de $2^{(20-1)} = 524288$ protocélulas.

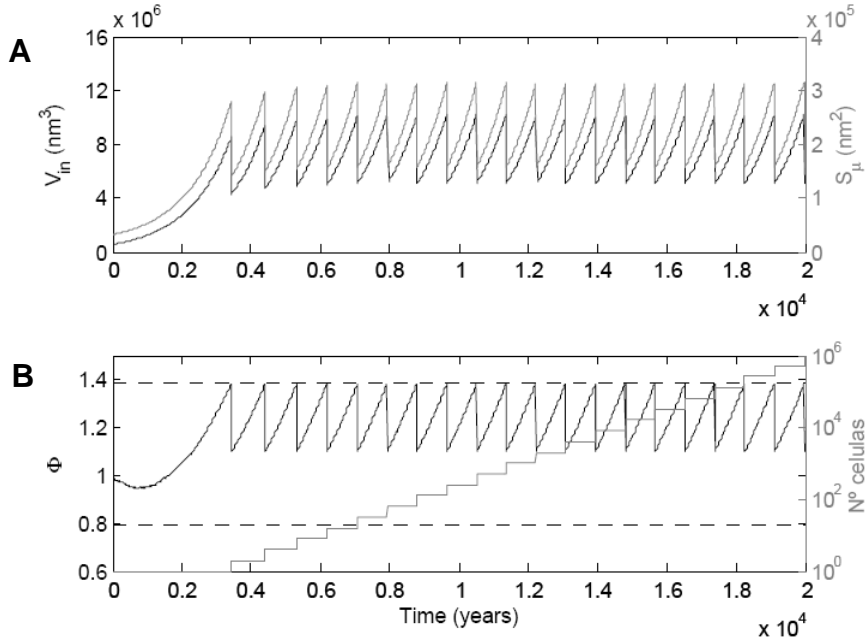


Figura 8.14 Comportamiento dinámico obtenido con un sistema protoceular autoproductivo en el que existe una continua acumulación interna de un subproducto metabólico Z. Además de considerarse que $ST \rightarrow l$, se ha supuesto que $SU \rightarrow Z$, siendo Z un subproducto distinto de W incapaz de atravesar la membrana por difusión. Por lo demás, se ha conservado el modelo protoceular de la Figura 8.10. (A) Tanto el volumen intracelular V_{in} como la superficie de membrana protoceular S_{μ} siguen dinámicas crecientes, gracias a la incesante acumulación de Z en el interior acuoso protoceular y a la permanente síntesis del lípido l, respectivamente. La adecuada relación entre el crecimiento en superficie y en volumen permite que se alcance un régimen reproductivo estacionario, en el cual el factor de estabilidad Φ aumenta y alcanza la condición de división repetidamente sin que se reduzca progresivamente el tamaño protoceular. (B) Junto a la evolución temporal del parámetro Φ (B, en negro) se representa el curso temporal del número total de protocélulas, que aumenta exponencialmente (B, línea en gris). Los procesos protometabólicos internos mantienen una escala temporal general de años. $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ año}^{-1}$ y $D_S = D_T = D_U = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (resto de parámetros con valores fijos iguales a los de apartados anteriores).

⁹⁴ En realidad, debe tenerse en cuenta que se ha supuesto que con cada división se generan dos protocélulas hijas idénticas (ver Material y Métodos). Por eso, aunque las fluctuaciones afecten de manera particular a las trayectorias de cada célula individual, el comportamiento general a grandes rasgos puede inferirse aproximadamente con los resultados de una sola protocélula de cada generación, sabiendo además que en estas condiciones el sistema se desarrolla alejado de puntos de bifurcación.

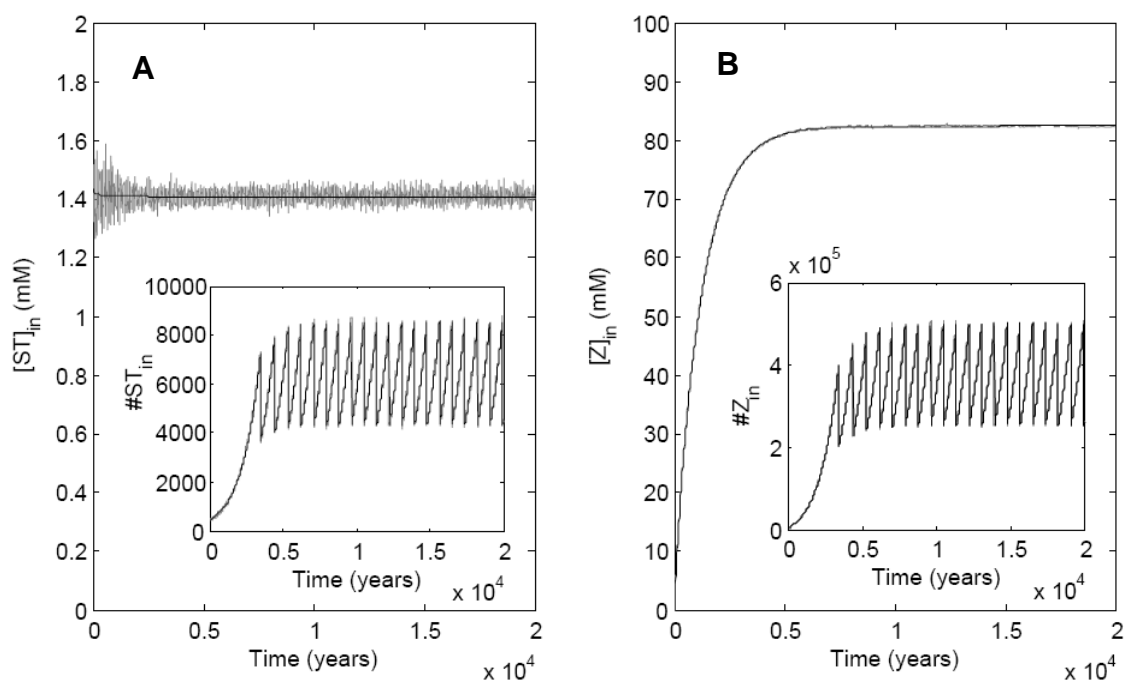


Figura 8.15 Evolución temporal de la concentración de metabolitos en el interior protoceular considerando el modelo de sistema protoceular autoprodutivo capaz de sintetizar lípido 1 y un subproducto Z. Los resultados de simulación obtenidos son los que corresponden a las condiciones de la Figura 8.14 (escala temporal de años para los procesos protometabólicos, $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ año}^{-1}$ y $D_s = D_r = D_v = 3.78 \times 10^5 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). (A) A pesar de la continua expansión que sufre el volumen intracelular y de las subsecuentes divisiones, las concentraciones de los distintos intermediarios metabólicos se conservan en un estado operativo o funcional – aquí se muestra el resultado para el metabolito ST. Esto significa una extraordinaria capacidad del protometabolismo para autoabastecerse y adaptar la síntesis de sus componentes al ritmo al que crece el tamaño celular. En términos de número de moléculas, se observa que las poblaciones de intermediarios experimentan un crecimiento incesante con el tiempo (sólo limitado, como en el caso del volumen, por los fenómenos de división) (inserto). (B) La producción neta del subproducto impermeable Z hace que dicho compuesto se acumule constantemente en el medio acuoso interno: su población aumenta permanentemente (inserto). Esto en última instancia explica el aumento continuado del volumen intracelular. La respuesta del volumen a la acumulación de Z permite entender a su vez que la concentración de Z alcance un estado estacionario. En gris: resultados de simulación estocástica; en negro: resultados deterministas.

Más allá de su continua eficacia y productividad, un aspecto interesante del régimen reproductivo obtenido es su estacionariedad, que se manifiesta tanto en lo que respecta a la dinámica del compartimento como a la del protometabolismo. Enseguida el patrón de comportamiento de las sucesivas generaciones converge, conservándose así toda una serie de propiedades esenciales: Con cada división se vuelve a los valores de superficie y de volumen protoceulares característicos de la generación g anterior, y se repite la tendencia seguida por la geometría del compartimento en la célula parental. Así mismo, el tiempo de vida de cada generación o periodo entre divisiones consecutivas Δt_g se hace regular (ver de nuevo (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2013)). Esto queda patente por la homogeneidad de los picos de sierra en la Figura 8.14. Pero además, la concentración interna de los distintos metabolitos se mantiene estable fluctuando en torno a su valor característico de estado estacionario determinista funcional, inalterada por la continua expansión del volumen y las sucesivas divisiones. En la Figura 8.15A se muestra como ejemplo la tendencia seguida por la concentración de ST. Obsérvese cómo únicamente la magnitud de las fluctuaciones se reduce tempranamente coincidiendo con el cambio en el tamaño protoceular durante la primera generación, pero luego permanece prácticamente constante sobre el mismo valor promedio de concentración. La homeostasis en los niveles de

concentración de los intermediarios evidencia un adecuado control por parte de los mecanismos protometabólicos de reemplazo para reponer y producir los metabolitos al ritmo al que crece el volumen interno (ver inserto a Figura 8.15A).

También se ha creído oportuno representar la evolución temporal de la concentración de Z (Figura 8.15B). Aunque la acumulación de este subproducto en el medio intracelular es irrefrenable, su concentración también termina alcanzando un estado estacionario. En este caso la estacionariedad viene determinada precisamente por el hecho de que el volumen interno se adapta a crecer con la misma velocidad con la que lo hace el número de moléculas de Z. La concentración de Z se mantiene durante los fenómenos de división (siempre la carga molecular se reparte equitativamente entre las dos células hijas, de mitad de tamaño que la madre), pero lógicamente el número de moléculas sí experimenta un patrón aserrado (ver inserto a Figura 8.15B). Ya se ha señalado que sin producción neta de Z no crecería el volumen. Es curioso cómo un fenómeno tal como el de acumulación de subproductos en el interior protocelular, que en su momento se describiera como un factor negativo para el automantenimiento protocelular (posibilidad de choque osmótico), ahora resulte aparentemente indispensable para el sistema plenamente autoproduktivo a la hora de conseguir condiciones de reproducción sostenida.

En resumen, las implicaciones de haber alcanzado un régimen de reproducción estacionario es que las protocélulas hijas se vuelven réplicas, en sentido estricto, de las progenitoras; la organización protoelular se transmite de generación en generación (se *re-produce*) con total fidelidad. Por supuesto, las características propias del linaje protoelular (a saber, el valor de S_p y V_{in} de las sucesivas generaciones, Δt_g , etc.) varían considerablemente al plantearse otras cinéticas de producción del lípido l o del subproducto Z. Más específicamente, se han realizado algunos ensayos con valores distintos de la constante cinética de producción de Z, k_s , y también se han probado diferentes estequiometrías tanto en la producción de Z como en la de l (por ejemplo $ST \rightarrow 2l$). Sin embargo, algo que resulta esclarecedor en estos estudios es que el fenómeno (como tal) de reproducción estacionaria se extiende para una relativa variedad de condiciones. En contra de lo que uno podría pensar, no es un hecho fortuito asociado a unas circunstancias muy específicas, no está atado a un estrecho margen de valores de los parámetros, sino que es un comportamiento relativamente flexible, robusto, con el modelo protoelular considerado. Y esto ha facilitado poder dar un paso más allá y considerar el último caso a tratar, aquel en el que el lípido de síntesis interna es verdaderamente un lípido distinto del que originalmente forma la membrana prebiótica (Figura 8.16).

Con objeto de preservar las características del protometabolismo, el modelo protoelular adoptado a continuación consta, como ilustra la Figura 8.16, de un esquema cinético de procesos internos similar al considerado hasta ahora. La principal novedad es que la reacción interna irreversible r_{11} no genera el mismo tipo de lípido prebiótico l presente inicialmente en la membrana, sino un lípido L algo más complejo (por ejemplo un lípido de doble cadena), con unas propiedades distintas a las del lípido sencillo l: Al lípido l se le han seguido atribuyendo en las simulaciones unas propiedades semejantes a las del LA, mientras que al lípido L se le han asignado de forma realista propiedades dinámicas y geométricas del DLPC (Tabla 8.1). Dada su gran hidrofobicidad, el lípido de síntesis L presenta también por su parte un equilibrio de autoensamblaje muy favorable a su integración en la membrana, por lo que a medida que vaya siendo producido internamente, se insertará rápidamente en la bicapa. Sin embargo, las implicaciones que esto plantee sobre el compartimento no serán ya sólo como antes las de un crecimiento continuado de la superficie de membrana (un crecimiento de hecho más rápido que con la producción de l, dada la mayor superficie de cabeza polar de la molécula L), sino las de un cambio en las propiedades de permeabilidad y estabilidad de la membrana que vendrá motivado

por la progresiva transformación de la composición lipídica de la bicapa (recordar Apartado 8.2). Precisamente, el interés por este modelo radica en analizar cómo inciden estos cambios físicos de la membrana sobre el funcionamiento global del sistema protocelular.

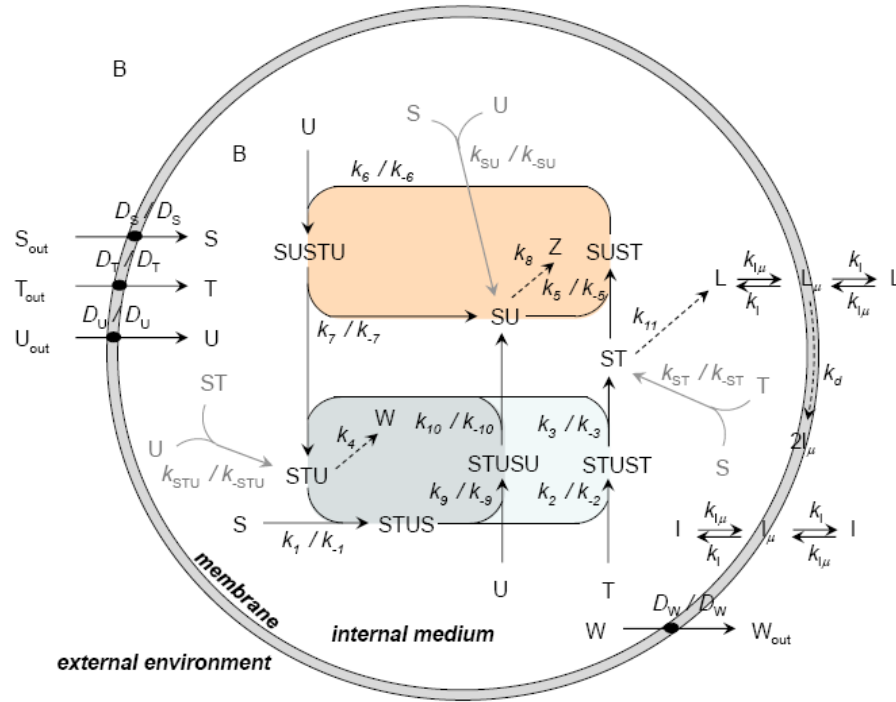


Figura 8.16 Modelo cinético de un sistema protocelular plenamente autoproductivo que cuenta con la síntesis interna de un lípido relativamente complejo L. La membrana, formada originalmente por el ensamblaje de un lípido sencillo I disponible en el entorno prebiótico, limita el acceso de los precursores ricos en energía (S, T y U) al medio intracelular, condicionando así el grado de funcionamiento del protometabolismo subyacente. Éste, a diferencia de aquel presentado en la Figura 8.10, es capaz de generar (en virtud de sus transformaciones) un subproducto no reactivo impermeable Z que se acumula en el medio acuoso interno, así como un lípido L relativamente más complejo que I, de doble cadena. A medida que L va siendo sintetizado, es absorbido rápidamente (dada su hidrofobicidad) por la bicapa de membrana, induciendo no sólo un aumento de la superficie de la membrana, sino cambios en las propiedades de permeabilidad y estabilidad de ésta que podrán afectar a su vez al funcionamiento global del sistema. El lípido L puede sufrir espontáneamente en la membrana una degradación para dar dos moléculas de I. Este proceso, con una constante cinética asociada denominada k_d , permite obtener estados finales de coexistencia de ambos tipos de lípido en la membrana y explorar así el comportamiento con distintos grados de conversión de la membrana, es decir, con distinta abundancia relativa de lípido L. La degradación de L se considera una reacción irreversible, al igual que su síntesis, la síntesis de Z y la producción de W. El resto de procesos son todos reversibles.

Debe indicarse que el modelo incluye adicionalmente un proceso espontáneo de degradación irreversible del lípido L en membrana, en el cual se regeneran moléculas de I (dos por cada molécula de L consumida, tomando en consideración la doble cadena del DLPC). Este proceso, con una constante cinética asociada k_d , actuará oponiéndose a una conversión completa de la membrana, y permitirá por tanto explorar el comportamiento con distintos grados de conversión de la membrana.

En las simulaciones se ha supuesto como aproximación, de igual modo que se hiciera en el Apartado 8.2, que el coeficiente de difusión molecular de los solutos (en este caso S, T, U y W) a través de la bicapa varía con la fracción molar del lípido L en membrana de acuerdo a una función no lineal equivalente a la determinada para la CF en los modelos experimentales de vesículas

mixtas LA/DLPC. Es decir, se ha implementado una curva de permeabilidad dependiente de composición idéntica a la de la Ecuación 8.16. En cualquier caso, para poder explorar de manera efectiva las posibles repercusiones de un cambio en la composición y permeabilidad de la membrana, se ha escogido estratégicamente una escala temporal para los procesos protometabólicos internos intermedia: suficientemente larga para evitar (al menos con la composición pura inicial de membrana) el colapso de las especies protometabólicas, pero suficientemente corta para asegurar que las concentraciones de los distintos intermediarios metabólicos se mantienen en valores funcionales subóptimos y por tanto tensionados, condicionados por la velocidad limitada de acceso de los precursores al medio intracelular. Así, el tiempo en todas las constantes cinéticas de reacción toma unidades de días, siendo $k_4 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ día}^{-1}$.

La Figura 8.17 resume el comportamiento dinámico protoceular obtenido por simulación estocástica con diversos valores de la constante cinética de degradación de L k_d . En efecto, la síntesis de L provoca un cambio en la composición lipídica de la membrana, un cambio que resulta más o menos fuerte dependiendo de la velocidad con la que opera el proceso compensatorio de degradación de L. Cuando el valor de k_d es relativamente alto, la mayoría del lípido L producido es restituido por moléculas de tipo l y se alcanza en la membrana un estado estacionario de composición lipídica en el que predomina la especie sencilla de lípido. Esto sucede por ejemplo cuando $k_d = 0.010 \text{ día}^{-1}$: en el estado final, la superficie relativa de membrana ocupada por lípido complejo L no supera el 10% ($\chi_{S,t \rightarrow \infty}^L \approx 0.1$) (Figura 8.17A, primera columna). Por el contrario, cuando el valor de k_d es menor, la diferencia entre la velocidad de producción de L y su degradación es más acusada, y se favorecen estados estacionarios de coexistencia en membrana de ambos tipos de lípido pero en los cuales la abundancia relativa del lípido L es mayor (Figura 8.17, B y C). En el caso extremo en el que no existe degradación alguna de L ($k_d = 0$), la conversión de la membrana es total (Figura 8.17D, primera columna). Entonces el estado definitivo será de composición pura: el lípido L terminará por imponerse del todo, si bien este proceso tarda lógicamente más tiempo en completarse.

Es interesante el hecho de que independientemente del grado de conversión que experimenta la membrana, ya sea con uno u otro valor de la constante cinética k_d , el sistema protoceular mantiene la capacidad de reproducirse (Figura 8.17, segunda columna). Más aún, en cualquiera de los casos termina alcanzando un régimen de reproducción estacionario, si bien el ruido asociado al confinamiento en pequeños volúmenes genera ligeras diferencias entre los ciclos consecutivos de división (el patrón aserrado que sigue el volumen intracelular no es estrictamente regular en la práctica). Un aspecto notorio en la Figura 8.17 es que el tamaño protoceular característico del régimen estacionario de división varía de unos casos a otros; concretamente, disminuye conforme la conversión de membrana es mayor. La explicación a este fenómeno es aparentemente sencilla, al menos en un supuesto ideal de una actividad protometabólica semejante (aumento similar del volumen intracelular): la molécula de L tiene una superficie de cabeza polar bastante mayor que l (0.6 nm^2 frente a 0.2 nm^2). Cuando la degradación de L predomina sobre su síntesis (escasa conversión lipídica), la superficie de membrana crece fundamentalmente motivada por lípido l generado por reconversión de L (2l por cada molécula de L sintetizada, es decir $2 \times 0.2 \text{ nm}^2$), mientras que cuando la degradación es escasa, la superficie de membrana crece aproximadamente al ritmo al que L es sintetizado, es decir a un ritmo mayor ($\sim 0.6 \text{ nm}^2$ por molécula de L sintetizada). Este crecimiento más rápido de la superficie favorece que la condición de división se alcance con volúmenes protoceulares menores.

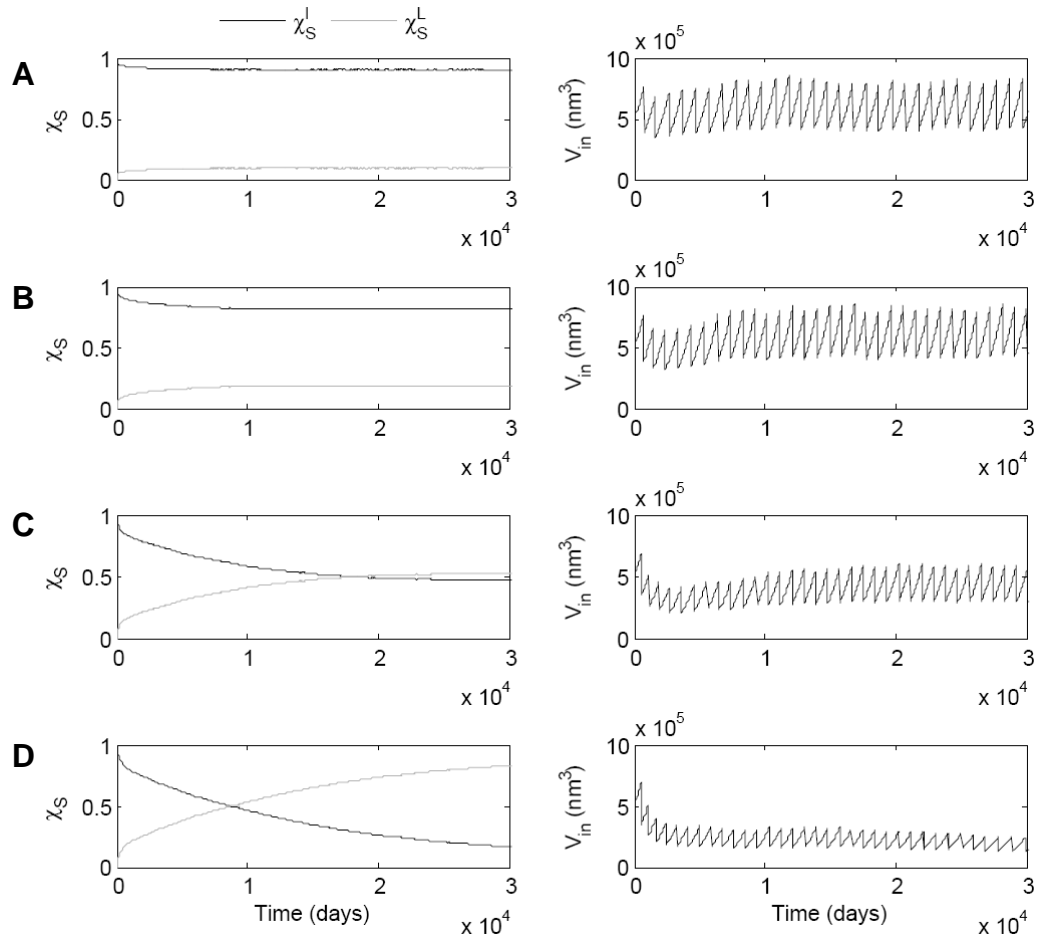


Figura 8.17 Comportamiento dinámico obtenido con el sistema protocelular autoprodutivo de la Figura 8.16 en respuesta a la síntesis interna de lípido complejo L. En la primera columna se muestra la evolución temporal de la composición de membrana, en términos de la superficie relativa de membrana ocupada por lípido sencillo l (χ_S^l , en negro) y por lípido complejo L (χ_S^L , en gris) a cada instante de tiempo de la simulación. Conforme L va siendo sintetizado, se inserta en la bicapa, lo que supone un cambio progresivo en la composición y propiedades de la membrana (por ejemplo $D_s = D_T = D_U = D_W$ varían – ver texto). Esta conversión resulta más o menos acusada según el balance con la velocidad del proceso de degradación del lípido L en membrana, en el cual se regeneran dos moléculas de l. Diversos estados finales de coexistencia en membrana de ambos tipos de lípido se obtienen con distintos valores de la constante cinética k_d (A-D), observándose lógicamente un mayor enriquecimiento en L a medida que se consideran valores de k_d menores. $k_d = 0.010 \text{ día}^{-1}$ (A), 0.005 día^{-1} (B), 0.001 día^{-1} (C), 0 día^{-1} (D). Independientemente del grado de conversión que experimenta la membrana, en cualquiera de los casos el sistema protocelular se mantiene capaz de reproducirse de modo permanente y termina alcanzando un régimen de reproducción estacionario, si bien el tamaño protocelular característico de este régimen varía de unos casos a otros, como muestra el curso temporal del volumen intracelular en la segunda columna. En todos los experimentos se ha escogido una escala temporal general de días para los procesos protometabólicos y se ha supuesto $k_1 = k_8 = k_{11} = 0.3 \text{ día}^{-1}$.

La cuestión ahora es: ¿puede el grado de conversión de la membrana afectar – además de al tamaño del compartimento – a otros rasgos de la dinámica reproductiva protocelular? Se ha analizado con interés la velocidad de reproducción celular en los distintos regímenes estacionarios hallados con los diferentes valores de k_d . En principio, de acuerdo con la reflexión que se ha hecho en el último párrafo, cabría esperar una frecuencia de división algo más rápida en el caso de mayor conversión de la membrana, en el que el lípido L es más abundante en la bicapa (es donde la superficie de membrana crece más eficientemente en relación con la producción interna de L). Sin embargo, sorprendentemente, el tiempo entre divisiones consecutivas resulta en realidad menor en

los casos en los que la conversión de membrana es parcial y ambos lípidos coexisten en la bicapa con cierta abundancia en el régimen de reproducción estacionario. Por ejemplo, con $k_d = 0.001 \text{ día}^{-1}$, que ofrece un estado final en el que aproximadamente la mitad de superficie de membrana queda cubierta por cada tipo de lípido ($\chi_{S,t \rightarrow \infty}^L \approx 0.5$), el tiempo promedio de cada generación en la situación de estacionariedad es 909 días. 1076 días es en cambio el tiempo de vida generacional cuando $k_d = 0$ y $\chi_{S,t \rightarrow \infty}^L = 1$. No obstante, es en este punto donde entra en juego la permeabilidad de la membrana y el nivel de funcionamiento del protometabolismo interno, como se explica a continuación.

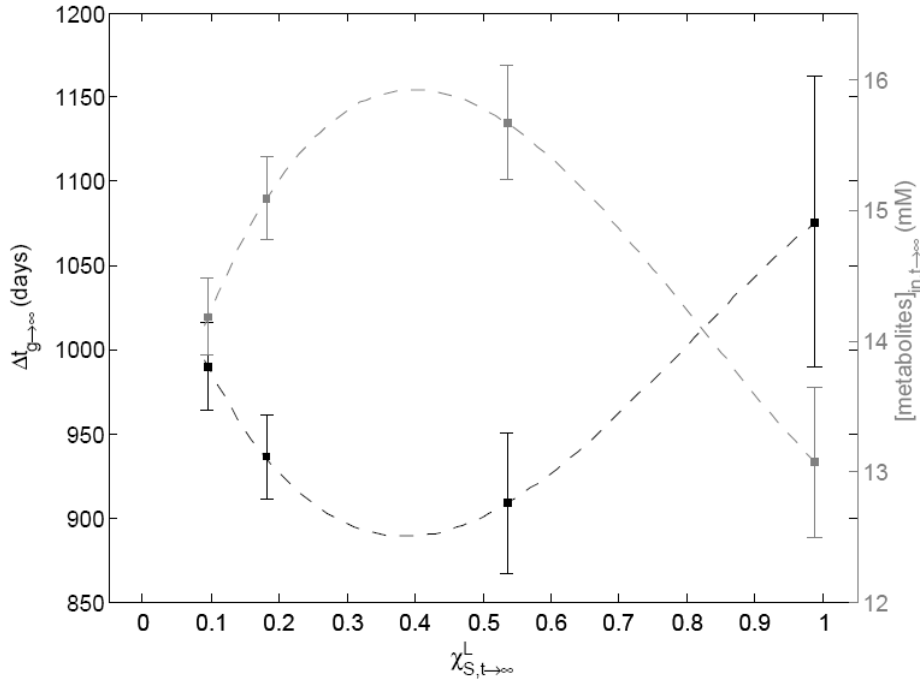


Figura 8.18 Ritmo de división protoceular y niveles de concentración de metabolitos internos que resultan con los distintos grados de conversión de la membrana obtenidos con los experimentos estocásticos de la Figura 8.17. En abscisas figura la superficie relativa de membrana ocupada por lípido L a tiempo suficientemente largo (las simulaciones de la Figura 8.17 han sido extendidas hasta un total de 60000 días para asegurar estacionariedad en la composición). El eje de ordenadas izquierdo muestra por su parte el tiempo de vida generacional en el régimen reproductivo estacionario ($g \rightarrow \infty$), tiempo que ha sido estimado y descrito para cada caso como la media y la desviación típica de los periodos entre divisiones consecutivas obtenidos con las 20 últimas generaciones de la simulación correspondiente (cuadrados y barras de error verticales en negro). El eje derecho de ordenadas alude a la suma total de concentraciones de los distintos intermediarios protometabólicos (es decir, de todos los metabolitos exceptuando los precursores y los productos finales no reactivos) en el medio intracelular, una vez en el régimen reproductivo estacionario. Esta suma total de concentraciones se representa para cada condición como la media y desviación típica a lo largo del intervalo de tiempo comprendido entre los 40000 días y los 60000 días (cuadrados y barras de error verticales en gris). Los valores promedio hallados de tiempos de división así como de concentración se han ajustado a funciones polinómicas (líneas discontinuas). Ambas tendencias sugieren un óptimo de funcionamiento a valores intermedios de abundancia relativa de L en membrana, para los cuales la bicapa es muy heterogénea y a su vez muy permeable.

Realmente, la actividad protometabólica también resulta sensible al grado de conversión de la membrana. La permeabilidad de la bicapa, como vimos, no depende linealmente de su composición lipídica, sino que experimenta un máximo coincidiendo aproximadamente con las condiciones de mayor heterogeneidad en la superficie de membrana (recordar inserto de la Figura 6.11). Y esto, para el protometabolismo interno, que se desarrolla limitado por la velocidad de

adquisición de los precursores S, T y U, significa precisamente un funcionamiento más eficiente en aquellos casos en los que la membrana experimenta una conversión parcial y finaliza con una composición mixta. En efecto, se ha comprobado que las concentraciones de los intermediarios metabólicos son en su globalidad mayores (más cercanas al óptimo predicho para $q_x \rightarrow \infty$) en el régimen estacionario de reproducción correspondiente a las condiciones de la Figura 8.17B, y sobre todo, en el régimen que se obtiene con las condiciones de la Figura 8.17C. Es razonable entonces que este sea el motivo por el que la frecuencia de división también es mayor en estos casos: concentraciones más elevadas de intermediarios suponen un crecimiento más rápido tanto del volumen intracelular (mayor producción de Z), como de la superficie de membrana (mayor producción de L), y con ello previsiblemente un aceleramiento del ciclo de reproducción. En la Figura 8.18 se han representado conjuntamente los valores de tiempo de vida generacional y concentración total de intermediarios obtenidos a tiempo suficientemente largo con las distintas condiciones de k_d en función de la fracción de superficie de membrana ocupada por lípido L en el régimen estacionario. Se obtienen tendencias prácticamente simétricas, con lo cual todo parece indicar la implicación de la actividad protometabólica, y por tanto de la permeabilidad de membrana, en las diferentes velocidades de replicación.

La existencia de un óptimo en la velocidad de replicación ligado a composiciones lipídicas de membrana más permeables, permite idear con el modelo un escenario prebiótico de competición en el que aquellas organizaciones protocelulares que explotaran membranas en estadios intermedios de conversión (con mezclas de ambos lípidos) se impondrían. Así pues, en esencia, los resultados sugieren la importancia que podría tener la permeabilidad de la bicapa como posible propiedad selectiva primitiva en los primeros sistemas celulares reproductivos. No obstante, más allá inclusive de estas apreciaciones, queda claro que el escenario protoceular de plena autoproducción, que aquí se ha explorado tan sólo de forma muy preliminar, ofrece en definitiva una enorme variedad de comportamientos y nuevas posibilidades, y que por supuesto, estos habrán de seguir siendo desentrañados en futuros trabajos para poder obtener una mejor noción del funcionamiento y condiciones de viabilidad de los sistemas protobiológicos, como se remarca en la Discusión.

Capítulo 9

9 Discusión

A lo largo de este trabajo se ha desarrollado un modelo cinético plausible de sistema protocelular automantenido mediante cierre catalítico, compaginando los requerimientos conceptuales organizativos con las necesidades dinámicas asociadas a su planteamiento en un marco físico-químico realista. El estudio cinético realizado en las distintas fases de elaboración del modelo revela una serie de factores críticos para el desarrollo y mantenimiento del sistema, como son las velocidades de degradación de los catalizadores, el volumen de confinamiento, la velocidad de adquisición de nutrientes a través de membrana o la presión osmótica dentro del compartimento. Éstos se traducen en requisitos espacio-temporales que habrían de haberse cumplido para el establecimiento del sistema en condiciones prebióticas. Considerando estas restricciones, ya descritas de forma específica en cada una de los capítulos de resultados, en este capítulo se discute la relevancia prebiótica del modelo propuesto y las posibles limitaciones al origen de la organización biológica. Puesto que es posible además relacionar las distintas etapas de construcción del modelo con distintos estadios posibles de evolución prebiótica, la discusión se ha articulado de tal modo que se debate particularmente la robustez, posibilidades dinámicas y limitaciones que pudo suponer cada una de estas fases tempranas de complejización prebiótica, así como el papel que pudo jugar la organización en las transiciones entre las diferentes fases.

9.1 Cierre metabólico y automantenimiento en condiciones prebióticas

Para poder abordar el problema del origen de la organización biológica, se hace preciso contar con modelos cinéticos de sistemas químicos que, siendo lo suficientemente sencillos como para haberse podido generar espontáneamente, en condiciones prebióticas realistas, cumplan con unos requerimientos mínimos para explicar la autoorganización y el cierre operativo. En este trabajo de Tesis doctoral se ha establecido de hecho como punto de partida que, para poder progresar en complejidad dinámica y estructural, compuestos orgánicos relativamente simples debieron integrarse – más pronto que tarde – en protometabolismos con una organización circular. Por ello, el modelo que se ha analizado en el Capítulo 3 (Figura 3.1) consiste en un sistema sencillo de reacciones que presenta cierre metabólico. Más concretamente, constituye un ejemplo teórico de implementación química mínima de la idea original de sistema (M,R) (Rosen, 1991).

Consta de tres ciclos catalíticos interrelacionados de tal modo que todos los catalizadores implicados son productos del propio sistema.

En la elección del modelo han concurrido varios factores. Por una parte, la teoría de los sistemas (M,R) resulta un marco conceptual interesante. Es atractiva la idea de describir a los organismos vivos, en su esencia, en términos metabólicos, como conjuntos de reacciones que en su conjunto se suplen a sí mismas con el reemplazo de todos sus catalizadores. Por otro lado, como ya se explicó en la Introducción, la teoría original fue expuesta siguiendo razonamientos puramente formales, y tan sólo recientemente, en un esfuerzo por plantear la teoría de forma menos abstracta, se han propuesto modelos sencillos que recogen las características fundamentales de los sistemas (M,R) (Letelier et al., 2006; Cornish-Bowden et al., 2007). Se trata de una oportunidad sin precedente para explorar qué dinámica puede ofrecer un sistema sencillo con estas características. Así, uno de esos modelos, ligeramente adaptado, es el que se ha estudiado en este trabajo. Fundamentalmente, es a través del análisis del modelo cinético como se puede saltar del nivel de abstracción característica de la teoría a la posibilidad de comprobar su posible realización química: ¿Qué propiedades dinámicas exhibe el sistema? ¿Pudo haberse generado espontáneamente? ¿Pudo haber sido capaz de automantenerse en condiciones prebióticas? ¿Cuál puede ser en definitiva la relevancia de los sistemas (M,R) y del cierre metabólico en el origen de la vida?

Antes de discutir los aspectos dinámicos, debe señalarse que el modelo ha sido construido de forma lógica para satisfacer estequiométricamente las necesidades organizativas del reemplazo de sus catalizadores⁹⁵. Esto no significa que se trate del mínimo sistema que presenta cierre metabólico. Ciertamente, el análisis estructural demuestra que es irreducible: ninguno de los tres modos elementales de flujo que conforman este sistema es capaz de funcionar independientemente (se requiere la conjunción de los tres para completar el cierre). Sin embargo, es posible que sistemas más pequeños, con unas especificaciones distintas, sean también metabólicamente cerrados. Éste puede ser el caso de una única especie autocatalítica, o de un conjunto autocatalítico formado por dos catalizadores que se catalizan mutuamente (Figura 1.1B). Ahora bien, un sistema con menos de tres transformaciones inevitablemente supone la fusión de al menos dos de los tres procesos fundamentales de *metabolismo*, *reemplazo* y *cierre organizativo* previstos por Rosen (1991). Concediendo la posibilidad de que esta distinción sea útil para comprender el cierre organizativo en sistemas de mayor tamaño, y puesto que los sistemas prebióticos habrían involucrado fácilmente varias transformaciones, se ha considerado más conveniente preservar los tres procesos separados como tres ciclos catalíticos distintos⁹⁶. Esto ha permitido entre otros aspectos evaluar cómo contribuye cada tipo de proceso en la estructura y comportamiento global del sistema, y comprender mejor su papel en el automantenimiento (Figura 3.10).

Tres características dinámicas fundamentales hacen que el sistema analizado sea relevante como posible modelo de sistema prebiótico: su capacidad para alcanzar un régimen metabólico estable alejado del equilibrio, su robustez dinámica y estructural, y su capacidad para nuclear y autoconstruirse. Atendiendo a la primera característica, el sistema presenta, para un amplio rango de valores de los parámetros cinéticos, un estado estacionario determinista estable de

⁹⁵ Se recuerda de nuevo que aquí la dinámica se considera en todo caso posteriormente a los requerimientos organizativos. Otros modelos son elaborados para satisfacer primariamente unas necesidades cinéticas, y descuidan por contra la importancia de la organización e incluso la importancia de un esquema de reacciones que sea químicamente plausible (Wilhelm, 2009).

⁹⁶ Al mismo tiempo, un esquema con mayor diversidad molecular tal vez permita también a la larga mayor flexibilidad para adoptar nuevos procesos de complejidad creciente (por ejemplo, la capacidad para reconducir un flujo hacia la síntesis de un nuevo catalizador, o para controlar la síntesis de lípidos de membrana).

concentraciones no nulas de todos los intermediarios metabólicos. Así, cumple no sólo con los requisitos organizativos de un sistema (M,R) (Letelier et al., 2006), sino también con unos requisitos dinámicos. Esta distinción es importante: no sólo los catalizadores sufren degradación y al mismo tiempo son repuestos a través de reacciones de reemplazo, sino que al implementar de manera determinista el modelo cinético, se observa que los procesos de reparación compensan *eficientemente* la degradación que afecta a dichos catalizadores. De esta manera, el sistema puede operar indefinidamente en un régimen de automantenimiento, a pesar de la continua degradación de sus catalizadores. Esta propiedad confirma además que el sistema constituye verdaderamente un sistema autoproduktivo.

La estabilidad del sistema está condicionada por el valor de las constantes cinéticas de sus reacciones, y en especial por el valor de las constantes de degradación de los catalizadores. Este hecho resulta lógico, ya que la estabilidad general en realidad recae en la de los catalizadores, es decir en el balance entre unos procesos de reparación y otros de degradación. Dado que los procesos de reparación residen en las propias reacciones del sistema, su eficacia está limitada por las constantes cinéticas de dichas reacciones. Así, si las constantes de degradación son suficientemente altas en relación con el resto de las constantes cinéticas, la síntesis de los catalizadores no puede compensar su degradación. En esta situación no es posible el automantenimiento y el sistema colapsa.

En lo que respecta a la robustez y a la capacidad de nuclear, ambas propiedades están muy relacionadas. En el rango de valores de los parámetros en que el sistema puede desarrollarse, aparece biestabilidad: el estado estacionario de automantenimiento coexiste con el estado estacionario trivial (de velocidades de reacción y concentraciones nulas) y las cuencas de atracción de ambos en el espacio fase están separadas por una barrera separatriz (Figura 3.7). Ésta marca el umbral de concentraciones mínimo necesario para que el sistema evolucione hacia su construcción, es decir hacia el estado estacionario no nulo o de automantenimiento. Resulta que para valores relativamente bajos de las constantes de degradación, este umbral se encuentra muy alejado del estado estacionario de automantenimiento y próximo al estado estacionario trivial. Ello explica porqué el sistema en estas condiciones es tan robusto; es capaz de recuperarse ante una eventual pérdida casi completa de todos sus intermediarios. Puede resistir incluso la pérdida completa de muchos de ellos, algo que es indicativo de la alta capacidad para nuclear: basta disponer inicialmente de una cantidad suficientemente alta de alguno de los metabolitos intermedios para que el resto se formen espontáneamente por *expansión de la red* (Handorf et al., 2005), reconstruyendo el sistema estable y robusto. Esta cualidad se debe a la topología peculiar de la red, ya que siendo pequeña, casi todas sus reacciones son constructivas e implican el consumo de algún metabolito externo inicialmente disponible (S, T ó U).

¿Serían suficientes las propiedades anteriores para poder explicar la emergencia espontánea de un sistema semejante en condiciones prebióticas? Uno de los problemas que surgen con el modelo original es que todos los procesos de condensación exigen catálisis. La nucleación precisamente requiere ya no sólo la disponibilidad de los precursores externos, sino al menos una cierta cantidad inicial de alguno de los intermediarios de los ciclos catalíticos. Por muy baja que sea la concentración inicial de metabolito requerida como estímulo para la autoconstrucción del sistema, ¿cómo explicar la presencia de tal producto metabólico en ausencia total de metabolismo? Esta cuestión ya ha sido resuelta al considerar adicionalmente, de modo razonable, las reacciones no catalizadas de síntesis. Aunque la velocidad de estos procesos se ha supuesto mucho menor que la de las reacciones catalizadas, es suficiente para generar mínimas concentraciones de los distintos intermediarios. Entonces, ya no es posible la extinción completa de las especies moleculares; en todo caso, permanecen concentraciones residuales de todos ellos (en un estado estacionario

residual). Pero más interesante todavía, si los valores de las constantes de degradación de catalizadores son suficientemente bajos (Figura 5.2), la autoorganización del sistema es inevitable y las concentraciones evolucionan a los valores propios del estado estacionario de automantenimiento, independientemente de la condición de partida. Es posible explicar así la emergencia completa del sistema a partir de únicamente sus precursores⁹⁷.

Conviene indicar que en el modelo se ha supuesto que las reacciones de condensación están favorecidas termodinámicamente. Esto podría explicarse si los precursores S, T y U son moléculas ricas en energía y actúan como motor de los procesos metabólicos. En tal caso, en cada paso de síntesis se liberaría una cierta energía. Lógicamente, para mantener la coherencia termodinámica, los productos de degradación de los catalizadores serían formas inactivas, y por tanto moléculas distintas a los precursores, como por ejemplo s, t y u. En un escenario de Tierra primitiva, podría imaginarse a los precursores como moléculas activas con enlaces con grupos fosfato (Westheimer, 1987), tioles (Wächtershäuser, 1988) o tio-ésteres (de Duve, 1991). El sistema quedaría supeditado a la disponibilidad en el entorno de los precursores ricos en energía. Aun bajo una hipótesis de sopa primitiva, el agotamiento de recursos sería inevitable a la postre para un sistema primitivo heterótrofo (Szathmáry et al., 2005). El problema aquí se aminoraría si los productos de degradación s, t y u pudieran ser transformados de nuevo en precursores activos S, T y U, a través de procesos químicos externos que implicaran un acoplamiento con una fuente de energía exógena (por ejemplo radiación electromagnética, energía química, etc.).

Otros problemas más elementales suscita la cuestión de la posible emergencia del sistema en un escenario de química prebiótica: ¿Cómo conseguir una organización metabólica recursiva a partir de elementos interaccionantes de escasa complejidad? ¿Es plausible que un sistema sencillo de reacciones prebióticas adquiriese semejante capacidad autoorganizativa? La realización del sistema no sólo requiere la formación de moléculas con actividad catalítica, sino que además entraña la dificultad añadida de que éstas han de organizarse de tal modo que completen el cierre metabólico descrito en el modelo. Algunos autores han demostrado de forma teórica y mediante simulaciones que el cierre catalítico no es un fenómeno inalcanzable (King, 1982; Kauffman, 1986); subsistemas autocatalíticos debieron haber surgido inevitablemente como una propiedad emergente de redes no muy complejas de reacciones. El problema es que se requiere una alta especificidad de reacciones para permitir la preponderancia de los constituyentes de un subsistema autocatalítico y evitar la explosión proliferativa de otros compuestos. A mayor complejidad cinética de la red, más reacciones cruzadas inespecíficas se admiten, y por ello mayor debe ser la especificidad (King, 1982). Tal vez entonces, sistemas con cierre metabólico que fueran estructuralmente simples (como el que aquí se ha estudiado) serían inicialmente más factibles. En cualquier caso, sería deseable contar con modelos experimentales de simulación de química prebiótica que permitieran explorar mejor las posibilidades de emergencia de subsistemas con cierre metabólico, pero también los requerimientos cinéticos para su automantenimiento.

⁹⁷ La teoría de los sistemas (M,R) se centra principalmente en el problema del automantenimiento. Pero una estequiometría que permita explicar la formación de todos y cada uno de los metabolitos de un sistema autoproduktivo a partir de los precursores disponibles en el entorno, es crucial para poder abordar el problema de la autoconstrucción. Es decir, es fundamental para entender la emergencia de un sistema con cierre metabólico en condiciones prebióticas. En este sentido, otras teorías sobre el cierre organizativo sí han procurado incorporar además como requisito la capacidad de autoconstrucción. Entre otras, la teoría de conjuntos autocatalíticos (Kauffman, 1986), o la más reciente teoría de conjuntos RAF, cuyas siglas precisamente hacen referencia a dicho tipo de requerimiento (en inglés, *Reflexively Autocatalytic and Food-generated sets*) (Hordijk y Steel, 2004).

En efecto, una vez en el supuesto de que un sistema sencillo con cierre metabólico pudiera emerger espontáneamente en condiciones prebióticas, una serie de restricciones cinéticas limitarían su capacidad para automantenerse. La mayoría de los catalizadores biológicos actuales son enzimas, polímeros que pliegan en estructuras tremendamente complejas con una actividad catalítica de muy alta especificidad. Sin embargo, en el contexto del origen de la vida, la catálisis no pudo recaer en grandes polímeros. Seguramente, los catalizadores primitivos serían moléculas mucho más sencillas (de fácil formación), y probablemente se caracterizarían por una escasa actividad y una baja especificidad de sustrato. Se presenta por tanto la dificultad de formar organizaciones cerradas capaces de automantenerse con catalizadores tan rudimentarios. Aunque en este trabajo no se ha abordado explícitamente el problema de las reacciones de catálisis inespecífica, sí se ha analizado de forma genérica el efecto de la velocidad de degradación de los catalizadores, que en realidad permite evaluar de forma indirecta cómo de eficientes han de ser los procesos catalíticos de reemplazo⁹⁸. Se demuestra que la velocidad de pérdida de catalizadores es determinante, tanto para la emergencia del sistema (conforme aumentan las constantes de degradación, éste precisa concentraciones mayores de intermediarios para nuclear), como para el automantenimiento (el sistema colapsa cuando las constantes de degradación son demasiado altas respecto al resto de constantes cinéticas) (Figura 5.2). En definitiva, cabe preguntarse qué condiciones prebióticas habrían podido ser favorables para reducir la degradación y pérdida de catalizadores y propiciar así el establecimiento de un sistema de este tipo con cierre metabólico.

9.1.1 Degradación y pérdida de catalizadores primitivos

Como ya se ha señalado, para evaluar la relevancia prebiótica del modelo, sería útil disponer de información sobre la posible naturaleza química de sus componentes. Hasta ahora no se ha especificado de qué especies se tratarían. Los precursores S, T y U bien podrían corresponder con distintos aminoácidos, distintos nucleótidos activos, o incluso pequeños módulos oligoméricos tales como los que se propone que habrían podido interaccionar en un escenario de mundo RNA (Briones et al., 2009). Por supuesto, en condiciones primitivas, más probable parece un escenario de pequeños péptidos con actividad catalítica (Gorlero et al., 2009) u otras moléculas orgánicas sencillas. La cuestión es que aunque esta distinción no afectaría a las conclusiones generales del modelo, una caracterización química profunda sí permitiría determinar un rango realista de valores de las constantes cinéticas de degradación. Esto ayudaría a desvelar si tales condiciones se adecúan o no al rango de parámetros cinéticos en los que el sistema modelo puede automantenerse en un estado estacionario no trivial de concentraciones. Al mismo tiempo, este análisis arrojaría luz sobre el tipo de compuestos candidatos que podrían realizar con éxito esta organización en el origen de la vida.

En el modelo cinético, todas las constantes cinéticas distintas a las de degradación se mantienen con valores fijos. Pero conviene remarcar que la emergencia y automantenimiento del sistema, y por tanto su relevancia prebiótica, depende en última instancia de un compromiso entre eficiencias suficientemente altas de catálisis (el impulso por autoconstruirse) y velocidades de degradación relativamente bajas. Este principio sería también de aplicación para otros sistemas autocatalíticos, aunque en raras ocasiones (Szathmáry, 2007) se reconoce la importancia de las degradaciones. Un metabolismo catalíticamente cerrado compuesto por intermediarios estructuralmente simples, como el que aquí se idea, presentaría probablemente el inconveniente de exhibir eficiencias catalíticas modestas. Ahora bien, uno que involucrara módulos oligoméricos

⁹⁸ No debe escaparse que la acepción de *degradación* puede ser más amplia que lo que se refiere estrictamente a hidrólisis; puede recoger también modificaciones químicas de otro tipo que invaliden a las especies como catalizadores, o incluso el propio efecto de su pérdida por dilución, que se menciona en el texto más adelante.

complejos, podría mostrar potencialmente eficiencias (y especificidades) mayores, pero al mismo tiempo también estaría probablemente sujeto a mayores tasas de degradación de sus catalizadores, lo cual podría amenazar su mantenimiento. Hordijk y Fontanari (2003) han demostrado computacionalmente cómo la degradación puede afectar al mantenimiento de redes metabólicas que involucran largos polímeros mientras preserva otras formadas por pequeños oligómeros.

Sin mayor concreción material, uno también podría cuestionar si en la asignación de los valores de los parámetros cinéticos del modelo no se habrán sobredimensionado los correspondientes a los procesos catalizados. De ser estos valores muchísimo mayores que los correspondientes a los procesos de degradación, ¿qué relevancia tendría el hecho de hallar un espacio de parámetros “relativamente amplio” para el automantenimiento del sistema? Por supuesto, esta cuestión es complicada de valorar: del mismo modo que es difícil de establecer un rango admisible para las velocidades de degradación de los catalizadores primitivos, también es difícil determinar cuál pudo ser su eficiencia. No obstante, para mantener en la medida de lo posible un cierto realismo, en la implementación cinética del modelo se han considerado eficiencias de catálisis relativamente bajas: las constantes cinéticas de los procesos catalizados toman aproximadamente valores cuatro órdenes de magnitud mayores que las constantes cinéticas de los correspondientes procesos de condensación sin catalizar. Esta diferencia se ajusta razonablemente bien a la que se observa experimentalmente con compuestos orgánicos sencillos como catalizadores⁹⁹. Nótese por otro lado que las constantes cinéticas de los procesos de degradación se han hecho variar en un rango relativamente amplio en relación con el valor del resto de constantes de procesos monomoleculares.

Llegados a este punto, es adecuado valorar también la posible relevancia de las reacciones no catalizadas inespecíficas como factor adverso (no confundir con los problemas de catálisis inespecífica). En el modelo cinético no se especifica la dimensión temporal de los procesos: todos los valores de las constantes cinéticas permanecen expresados en unidades arbitrarias. Siempre que se hiciera de forma consistente, se podría asignar una escala temporal u otra a los procesos sin alterar en absoluto los resultados numéricos del estudio. Ahora bien, esto no significa que en la realidad todas las escalas temporales estuvieran permitidas o fueran igual de favorables. Ciertamente, como ya se apuntó en el Capítulo 4, las constantes cinéticas bimoleculares en bioquímica están circunscritas a un límite máximo de aproximadamente $1000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Es decir, la unidad de tiempo de los procesos definidos en el modelo no podría ser menor que el segundo (al menos con concentraciones expresadas en mM). Pero en el extremo opuesto, una escala temporal excesivamente larga no sería conveniente, ya que entonces comenzarían a preponderar los procesos no catalizados inespecíficos, que podrían arruinar el sistema. Afortunadamente, reacciones inespecíficas como la hidrólisis básica o ácida de ésteres y amidas suceden extremadamente despacio a pH intermedios, con valores de constantes cinéticas del orden de $10^{-11} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo cual sugiere que no supondrían amenaza alguna para el sistema (aun con escalas de tiempo de años para los procesos metabólicos, si las concentraciones permanecen en mM)¹⁰⁰.

⁹⁹ En los Resultados (Apartado 5.1) se mencionó el caso particular de la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, que sucede unas 10000 veces más rápido en presencia del complejo hierro-pirrol.

¹⁰⁰ La constante cinética de hidrólisis básica del metilacetato toma un valor aproximado de $10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C en condiciones alcalinas, pero a pH neutro toma $10^{-11} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Las constantes cinéticas de hidrólisis ácida del metilacetato y de hidrólisis (bien ácida o básica) de la acetamida no deben preocupar, pues son aún menores (A. Cornish-Bowden, comunicación personal). El motivo por el que estas constantes toman dimensión $\text{concentración}^{-1} \text{ tiempo}^{-1}$ es porque en realidad corresponden con reacciones bimoleculares: procesos catalizados por ácido o por base. En el texto se engloban como “no catalizadas” por no requerir propiamente de moléculas catalíticas.

También es importante considerar la influencia de factores externos ambientales que podrían afectar a la cinética, como es el caso de la temperatura. En el supuesto de que las interacciones entre los diversos metabolitos sucedieran en medio acuoso, un aumento en la temperatura ambiente se correlacionaría con un aumento de las constantes cinéticas de degradación, pero además también probablemente con el desplazamiento del equilibrio de las reacciones reversibles de condensación hacia un aumento de la disociación. En el equilibrio, la energía libre de Gibbs ΔG es cero, y se cumple que:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K^{\text{eq}} = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad ; \quad K^{\text{eq}} = \exp\left(\frac{-\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right) \quad \text{Ec. 9.1}$$

En los procesos de condensación se podría esperar que la variación de entalpía estándar fuese negativa, $\Delta H^\circ < 0$, y por ello que la constante de equilibrio K^{eq} disminuyera con la temperatura T . En esencia, el efecto global sería un desplazamiento hacia la desestabilización (colapso) del sistema. La disminución de la temperatura tendría en cambio el efecto contrario. Podría entonces concebirse un diagrama de bifurcación respecto a la temperatura, con un aspecto que sería presumiblemente parecido a aquel del diagrama frente a las constantes de degradación (Figura 9.1). Temperaturas relativamente altas supondrían el dismantelamiento del sistema, pero el fenómeno no sería necesariamente irreversible: gracias a las reacciones no catalizadas de síntesis, la red de reacciones tendría oportunidad de regenerarse de nuevo si la temperatura bajara lo suficiente. En último término, en un escenario de fuertes oscilaciones térmicas cabría esperar la continua realización del ciclo de histéresis, que implicaría periodos intermitentes de aparición y de desaparición del sistema.

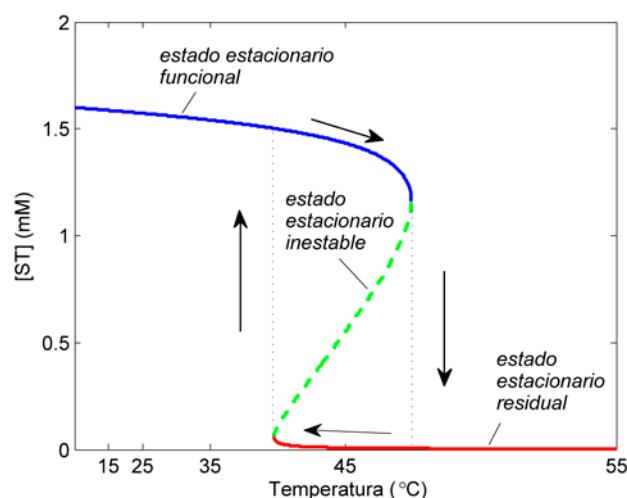


Figura 9.1 Representación esquemática del diagrama de bifurcación del sistema (M,R) frente a la temperatura. Se muestra el comportamiento hipotético de las soluciones estacionarias, inspirándose en el diagrama de bifurcación de la Figura 5.2. Los valores concretos mostrados en abscisas son hipotéticos (responden sólo a fines ilustrativos), si bien la escala entre ellos respeta la regla observada típicamente en trabajos experimentales de una duplicación de las constantes cinéticas con cada aumento de 10°C. Las flechas marcan el recorrido seguido con el ciclo de histéresis.

Hipotéticamente, en un contexto prebiótico, este tipo de sistema habría podido ensayar distintos intermediarios y explotar distintos ambientes hasta encontrar unas condiciones óptimas con las cuales las constantes cinéticas de degradación fueran relativamente bajas respecto al resto de constantes. Pero al margen de la pérdida de catalizadores por procesos estrictamente químicos, existe todavía un problema adicional para el correcto desarrollo y mantenimiento del sistema: en un entorno ilimitado, la dilución de los catalizadores sería un proceso continuo. Sería por ello

conveniente – quizá incluso necesario – para la realización prebiótica de un sistema con cierre metabólico, contar con algún medio de asegurar una total disponibilidad de precursores a la par que una correcta concentración de los catalizadores e intermediarios de la red. En este sentido, la adhesión o asociación de los procesos protometabólicos incipientes a superficies y compartimentos¹⁰¹ que limitaran la libre difusión de los catalizadores, pudo ser una enorme ventaja para la estabilidad de las primeras organizaciones prebióticas.

9.2 Compartimentación en condiciones prebióticas

En este trabajo se ha defendido un escenario de evolución prebiótica en el cual el desarrollo de un protometabolismo se habría dado, si no desde el mismo principio, sí muy tempranamente, en compartimentos. Los beneficios que pudo otorgar un compartimento en las primeras etapas de consolidación de redes metabólicas irían más allá de servir como una cierta barrera física para aminorar la pérdida de los intermediarios solubles del sistema. De entre las diversas propuestas que se ofrecen, las superficies minerales catalíticas, por ejemplo, habrían podido jugar, junto con los pequeños intersticios acuosos de su alrededor, un interesante papel (Wächtershäuser, 1988; Martin y Russell, 2003): las partículas minerales brindan la posibilidad de intercambiar moléculas reactivas con el medio acuoso, algunas de las cuales pudieron haber constituido una fuente de poder reductor (Deamer, 1997). Además, la existencia de pequeñas cavidades sinuosas entre ellas habría proporcionado una extensa superficie de interfaz donde se podrían haber favorecido reacciones de condensación (Ferris y Ertem, 1992) y la propia retención de los componentes del incipiente sistema protometabólico.

Los compartimentos autoensamblados basados en agregados lipídicos, ya sean vesiculares o micelares, también pudieron asistir y colaborar en la emergencia de los primeros protometabolismos (Deamer, 1997), en escenarios prebióticos por otro lado no necesariamente distintos al entorno de las partículas minerales (Hanczyc et al., 2003). Por ejemplo, se ha descrito experimentalmente cómo bicapas lipídicas pueden favorecer la polimerización de péptidos y ácidos nucleicos (Hitz y Luisi, 2000; Zepic et al., 2007; Olasagasti et al., 2011), así como servir de base catalítica para otras condensaciones (Namani y Walde, 2005). Por otro lado, como ya se señaló en la Introducción, este tipo de compartimentos lipídicos proporcionarían un microentorno de coexistencia de fases acuosas e hidrofóbicas, con gran potencial para promover nuevos procesos químicos difícilmente realizables en medio acuoso libre.

En todo caso, a pesar de las ventajas potenciales de una química prebiótica compartimentada, los compartimentos primitivos debieron haber impuesto al mismo tiempo una serie de condicionantes o restricciones dinámicas sobre la red de procesos protometabólicos subyacente. En este trabajo se han analizado particularmente dos cuestiones: (i.) el efecto del volumen de confinamiento y las fluctuaciones aleatorias asociadas a las poblaciones finitas de metabolitos; y (ii.) el problema de una accesibilidad limitada de los nutrientes al dominio de reacción. La primera de estas cuestiones se ha tratado de una forma general, aplicable a cualquier espacio compartimentado, mientras que la segunda se ha tratado ya de manera específica para el caso de vesículas formadas por bicapas lipídicas. Con los argumentos que se han dado hasta ahora, la predilección por estos compartimentos “blandos” (orgánicos), fruto de procesos de autoensamblaje, responde a razones obvias: resulta difícil pasar por alto las enormes posibilidades

¹⁰¹ En este punto el compartimento es entendido todavía en un sentido muy laxo, desprovisto de toda connotación funcional. Se podría tratar de una frontera física ajena a la propia organización, como por ejemplo una superficie mineral disponible en el entorno.

dinámicas que pudieron ofrecer estas estructuras, que además, tarde o temprano, siguiendo simplemente un argumento de continuidad con el mundo biológico, debieron pasar a asumir un papel esencial en el control de los procesos de transporte y transducción de energía característicos de los seres vivos (ver más adelante).

9.2.1 Volumen de confinamiento en compartimentos primitivos

El desarrollo de las reacciones prebióticas en entornos compartimentados debió suponer el confinamiento de los sistemas protometabólicos en volúmenes relativamente pequeños. Esto significa poblaciones moleculares finitas de los distintos intermediarios de la red, por lo que dichos sistemas hubieron de quedar sujetos a fluctuaciones cinéticas significativas. En este sentido, aunque el estudio determinista realizado sobre el modelo protometabólico descrito proporciona una descripción preliminar del posible comportamiento del sistema en condiciones prebióticas, es el estudio estocástico el que permite hacer un análisis fino considerando el posible efecto de las fluctuaciones derivadas del ruido interno. ¿Qué consecuencias dinámicas pudieron tener las fluctuaciones aleatorias sobre el funcionamiento del sistema en un compartimento primitivo?

Las simulaciones estocásticas, realizadas siguiendo el método de Gillespie, confirman que a volúmenes relativamente grandes el comportamiento dinámico del sistema es similar al obtenido siguiendo una metodología determinista, salvo por la evidente presencia de fluctuaciones estadísticas en torno a las curvas de evolución temporal de las concentraciones de intermediarios. No obstante, desde un planteamiento matemático existen diferencias sustanciales: en la región del espacio de parámetros en la que coexisten ambos estados residual (ó trivial, si se ignoran las reacciones no catalizadas de condensación) y de automantenimiento de concentraciones altas, no existe barrera separatriz alguna con la metodología estocástica. En todo caso existen curvas de isoprobabilidad de alcanzar uno u otro estado a tiempos relativamente cortos (Figura 5.6). Así, existe una probabilidad no nula de que se produzcan a largo plazo transiciones de uno a otro estado; la estacionariedad estocástica va referida a una distribución de tamaños poblacionales con la cual las probabilidades de tránsito entre diferentes estados se igualan¹⁰². Ahora bien, las líneas de isoprobabilidad del 95% y del 5% de evolucionar hacia el estado de coexistencia o de automantenimiento de concentraciones relativamente altas, se sitúan, con volúmenes altos, cercanas a la barrera separatriz determinista. Esto indica la enorme magnitud que ha de tener una fluctuación para dismantelar el sistema una vez en dicho estado de coexistencia. En tales condiciones, el tiempo requerido para observar tal fenómeno es tan enorme que el estado de coexistencia puede considerarse en la práctica estable, a saber, un régimen cuasiestacionario.

Varios efectos notorios se derivan del análisis con volúmenes de confinamiento pequeños, en los que predominan las fluctuaciones. En primer lugar, la estocasticidad amplía las posibilidades de emergencia o formación del sistema. A pesar de la síntesis no catalizada de intermediarios, con el tratamiento determinista existe todavía un rango relativamente amplio del espacio de parámetros en el que se requiere la disponibilidad inicial de concentraciones de intermediarios relativamente elevadas, por encima de un cierto umbral, para poder alcanzar el estado de automantenimiento (Figura 5.2). Concentraciones por debajo de la barrera separatriz

¹⁰² Conviene recordar que sólo en el caso en el que se ignoren los procesos no catalizados de síntesis la distribución estacionaria estocástica coincide con un único estado poblacional de los intermediarios (que es la extinción). En tal caso la extinción es una barrera absorbente, por lo que el sistema funcionando en un estado de coexistencia de concentraciones no nulas terminará extinguiéndose sí o sí, siendo este proceso irreversible: lógicamente, una vez extinguido, no hay posibilidad de una transición de retorno al estado no trivial de automantenimiento.

conducen inexorablemente al estado residual. En el tratamiento estocástico, las fluctuaciones pueden permitir la construcción del sistema a partir de condiciones de concentraciones situadas por debajo de la barrera separatriz determinista, aun cuando la probabilidad de un evento de este tipo disminuya considerablemente al alejarse de ésta. No obstante, si se considera un contexto de química prebiótica, presumiblemente tan dilatado en el tiempo, probabilidades mucho menores que un 5% pudieron ser suficientes para motivar la formación del sistema. En definitiva, este efecto positivo de las fluctuaciones pudo representar una ventaja para los volúmenes de confinamiento pequeños.

Al mismo tiempo, una vez formado el sistema, su confinamiento en un volumen pequeño también pudo ser un problema. Las fluctuaciones asociadas a pequeños volúmenes pueden provocar el efecto contrario de conducir al colapso del sistema. Cuanto mayor es la magnitud de las fluctuaciones, mayor es la probabilidad de que el sistema colapse a tiempos relativamente cortos. Por tanto, ¿cómo de grandes tuvieron que ser los compartimentos prebióticos para permitir el mantenimiento de un metabolismo de esta clase? Obviamente, es una cuestión de escala temporal. Para las condiciones de los parámetros y la escala de tiempo consideradas en las Figuras 4.7 y 5.7, se obtenía un valor crítico del volumen en torno a $1.4 - 4 \times 10^{-20}$ L. Esto significaba que la estabilidad de la red de reacciones era virtualmente imposible en volúmenes menores. Ahora bien, el tiempo requerido para la extinción aumentaba de forma tan considerable con el volumen de confinamiento, que el análisis con tamaños algo mayores permitía contemplar entonces el estado de coexistencia como un régimen indefinidamente estable. Y a su vez, este hecho validaba la noción de un límite más o menos estrecho de volumen crítico para el mantenimiento de los procesos prebióticos.

Si se realiza el ejercicio de comparar el valor de volumen crítico hallado con los volúmenes de confinamiento presupuestos en los escenarios de evolución prebiótica (Martin y Russell, 2003; Hanczyc et al., 2003), se puede comprobar fácilmente que es demasiado pequeño como para imponer una restricción significativa sobre estos escenarios. En la Figura 9.2 se presenta el comportamiento del sistema metabólico con el volumen, relacionando éste con el tamaño de algunas estructuras biológicas. El límite obtenido para el funcionamiento del sistema protometabólico ($1.4 - 4 \times 10^{-20}$ L) equivale al volumen de una esfera de 15 – 20 nm de radio. Incluso las vesículas lipídicas (liposomas, hasta del tamaño de vesículas unilamelares pequeñas) presentan al menos 15 nm de radio (Walde, 2006). Los espacios intersticiales de las partículas minerales porosas habitualmente tienen tamaños del orden de micras (es decir, al menos 10^{-5} L). Sólo las micelas podrían tener tamaños menores al indicado.

No obstante, el valor de volumen crítico puede cambiar sustancialmente con los parámetros del modelo, por lo que se trata de un factor limitante potencial a considerar. Basta señalar que el simple hecho de reemplazar consistentemente en el modelo las unidades de las concentraciones (que aparecen en mM) por μ M, supondría un valor de volumen crítico 1000 veces mayor, es decir $1.4 - 4 \times 10^{-17}$ L (el equivalente a una esfera de 200 nm de radio) para las condiciones anteriores de los parámetros. En tal caso el efecto restrictivo sería notorio. Dado que las transiciones de fase inducidas por ruido son frecuentes en sistemas complejos (Solé et al, 1996), no es difícil imaginar que otros modelos de sistemas automantenidos pudieran estar afectados de modo similar por la existencia de un volumen crítico. El volumen de confinamiento se postula así, junto a las velocidades de pérdida de catalizadores, como un importante factor en el mantenimiento de las primeras redes protometabólicas, un factor que convendría explorar más en futuros trabajos tanto computacionales como experimentales con sistemas compartimentados.

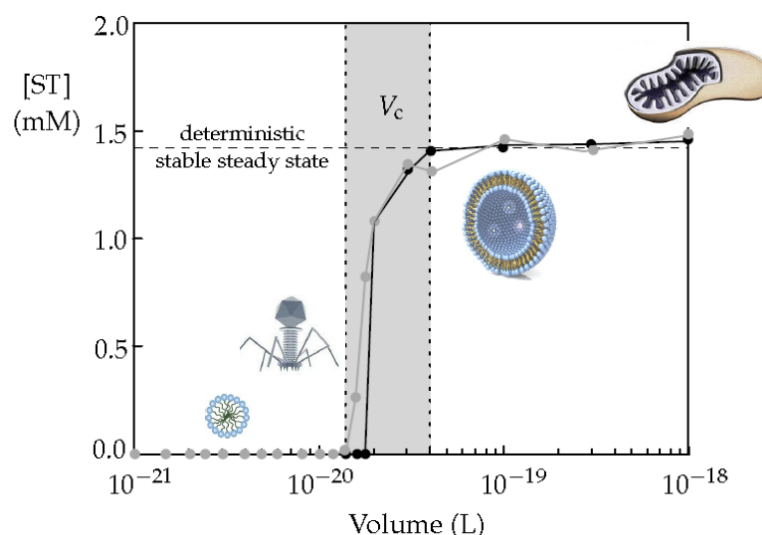


Figura 9.2 Efecto de las fluctuaciones derivadas del ruido interno sobre la capacidad de automantenimiento del sistema (M, R). Existe un volumen de confinamiento crítico por debajo del cual las fluctuaciones en las poblaciones de intermediarios son tales que arruinan el sistema (las concentraciones terminan en un estado residual, o en uno trivial si es que no se consideran los procesos no catalizados de síntesis – el caso de esta figura). El valor de volumen crítico depende de los parámetros y de las unidades de las variables del sistema. No obstante, algunas estructuras biológicas se muestran como referencia de tamaños: de izquierda a derecha, una micela, un virus T4, un liposoma, y una mitocondria (su posición es aproximada; por ejemplo, un liposoma puede adoptar muy diversos tamaños – hasta varias micras; una mitocondria tiene un volumen en torno a 10^{-17} L).

En la situación en la que se consideran los procesos no catalizados de síntesis y existe un estado residual de concentraciones, quizá podría cuestionarse la relevancia del volumen crítico: ¿no tiene acaso el sistema, una vez dismantelado, probabilidades de construirse de nuevo a partir de fluctuaciones generadas en torno al estado residual? Lo cierto es que para un mismo tamaño del compartimento, las fluctuaciones alrededor del estado residual son muchísimo menores que aquellas alrededor del estado de automantenimiento o coexistencia. Esto quiere decir que, a pesar de los dos efectos aparentemente contrapuestos de los volúmenes pequeños (que favorecen la emergencia del sistema a la par que dificultan su mantenimiento), en la práctica la probabilidad de recuperación en un determinado intervalo de tiempo es despreciable en comparación con la de extinción. Volúmenes por debajo del valor crítico no serían en términos generales favorables, pues implicarían que el sistema pasara la mayoría del tiempo en el estado residual, a pesar de saltos esporádicos al estado funcional de automantenimiento. En cualquier caso, para poder dar explicación al establecimiento del sistema en condiciones prebióticas, se podría idear el siguiente escenario hipotético: en primera instancia, un entorno relativamente pequeño habría podido motivar eventualmente el surgimiento del sistema a partir de concentraciones mínimas de intermediarios; una vez establecido el sistema, una adaptación a volúmenes mayores habría permitido su “fijación” y su robustez en un rango de valores de las constantes de degradación de catalizadores más amplio.

Finalmente, también en este punto es conveniente considerar la escala temporal de los procesos. Esto es importante, ya que uno de los factores adicionales cruciales en la capacidad de automantenimiento de los sistemas protometabólicos sería la habilidad para responder rápidamente y contrarrestar perturbaciones fortuitas, debidas a causas externas, en las concentraciones de sus constituyentes, y que pudieran ser amenazantes. En este trabajo se ha medido el tiempo necesario para la recuperación del sistema (o para su extinción) a partir de condiciones críticas de concentraciones situadas en los valores propios del estado estacionario

determinista inestable. Se observa que las fluctuaciones, y por tanto los pequeños volúmenes, favorecen una respuesta relativamente más rápida (Figura 4.5). De todos modos, resulta difícil poder trasladar esta discusión al contexto prebiótico sin una idea clara de cuál sería la escala temporal de los procesos prebióticos (Orgel, 1998). Sí puede señalarse que la unidad de tiempo de los procesos protometabólicos quedaría acotada por unas restricciones de cinética química (recordar los comentarios del Apartado 4.1): Los tiempos de transición serían probablemente suficientemente cortos en comparación con la escala temporal de factores relacionados con ruido externo (por ejemplo cambios en temperatura o presión) como para que el sistema tuviera oportunidad de recuperarse del todo de situaciones comprometidas, antes de ser afectado por fluctuaciones derivadas de ulteriores perturbaciones externas.

9.2.2 Accesibilidad limitada de nutrientes en compartimentos prebióticos

Dos cuestiones esenciales surgen al considerar la compartimentación temprana del protometabolismo en vesículas formadas por el autoensamblaje de lípidos: la composición de las membranas primitivas, y sus propiedades físicas de estabilidad y permeabilidad. Tradicionalmente, los modelos experimentales de vesículas primitivas se han encontrado con el dilema para conciliar la estabilidad con la relevancia prebiótica del compartimento. Las vesículas de ácidos grasos puras (formadas por un solo tipo de componente) son muy sensibles a factores externos, como son el pH, la fuerza iónica, la temperatura, o la concentración de monómero disuelto (Monnard et al., 2002; Walde et al., 2006). La estabilidad y permeabilidad de estas vesículas depende de la longitud de cadena acíclica, siendo en principio más estables e impermeables aquellas que contienen ácidos grasos insaturados de mayor tamaño, que al mismo tiempo más difícilmente estarían disponibles en condiciones prebióticas (Monnard y Deamer, 2002).

Recientes estudios realizados con mezclas de ácidos grasos y mezclas de éstos con algunos derivados lipídicos sencillos (Apel et al., 2002; Namani y Deamer, 2008; Mansy et al., 2008; Maurer et al., 2009) demuestran que ciertas combinaciones confieren mayor estabilidad a este tipo de compartimentos, tanto frente a cambios de pH como de fuerza iónica, temperatura o concentración. Indican que hay que tener en cuenta otra serie de factores, relacionados con la permeabilidad vesicular, como el grado de empaquetamiento lipídico en membrana, las irregularidades entre las diversas cabezas polares, etc. Se abre así un nuevo panorama en el que poder explorar combinaciones de pequeños compuestos anfifílicos que imparten estabilidad a vesículas que de otra manera, con una composición pura, serían más inestables. Por ello, frente a un escenario de aparente urgencia por explicar la aparición de compartimentos con lípidos complejos estabilizantes, estos avances refuerzan la hipótesis de que los componentes de membrana habrían podido sufrir un largo proceso de evolución antes de la aparición de compuestos complejos como los fosfolípidos de las biomembranas actuales (Monnard y Deamer, 2002).

Precisamente, en los experimentos del Capítulo 6 se han explorado las propiedades de estabilidad y permeabilidad de diversas vesículas de composición mixta, que tienen el aliciente de estar formadas por compuestos anfifílicos sencillos de cadena corta (12 carbonos) y servir como modelo de distintas fases evolutivas tempranas de transformación de la membrana, de acuerdo al esquema de Monnard y Deamer (2002). La pregunta que subyace es cómo pudieron afectar los cambios de composición de la membrana a las propiedades físicas de los primeros compartimentos, y qué implicaciones pudo tener todo ello para el desarrollo de los procesos químicos internos. En este trabajo se reclama la necesidad de un enfoque sistémico para poder comprender qué restricciones cinéticas pudo imponer el compartimento vesicular, y vislumbrar qué transiciones evolutivas pudieron darse con las primeras fases de cambio de la membrana. Por ello, se ha seguido una aproximación semiempírica: se ha compaginado el estudio *in vitro* de las propiedades

físicas de las membranas vesiculares con el análisis dinámico *in silico* del modelo protometabólico que viene describiéndose compartimentado en una vesícula semipermeable. El foco de atención se ha centrado concretamente en el problema que entraña la membrana como barrera que limita el libre acceso de nutrientes al protometabolismo compartimentado.

El análisis computacional del modelo protometabólico compartimentado demuestra que la capacidad de automantenimiento de la red de reacciones depende de la velocidad de adquisición de los precursores S, T y U desde el medio externo (considerado en este caso como el reservorio de nutrientes). Si las constantes cinéticas de incorporación de los precursores a través de la membrana son demasiado bajas en comparación con el curso general de los procesos químicos internos, no es posible abastecer la demanda interna, y se observa que todas las concentraciones de los intermediarios metabólicos caen a valores mínimos propios del estado residual (Figura 7.3). Estos resultados ofrecen una expresión concreta del problema del *autosofoco*, ya planteado y discutido de forma teórica por Szathmáry (2007), pero que requería un tratamiento más específico y detallado. En definitiva, el análisis indica que para el funcionamiento de un sistema protometabólico compartimentado como el indicado, tuvo que ser necesaria ya no sólo una velocidad de degradación relativamente baja de los catalizadores, sino una adecuada relación entre la permeabilidad de nutrientes a través del compartimento y la velocidad de operación del protometabolismo subyacente. ¿Cómo se relaciona esto con las propiedades de permeabilidad de las membranas primitivas? ¿Pudieron verdaderamente las vesículas prebióticas ser un limitante para el desarrollo de las primeras organizaciones protocelulares?

En el modelo cinético del sistema protometabólico libre en solución, se ha tenido la precaución de mantener unidades arbitrarias para la escala temporal de los procesos de reacción. Esto permite, al incluir el modelo en un compartimento, evaluar qué umbral de permeabilidad a nutrientes se requiere superar para el funcionamiento del sistema a distintas escalas de tiempo. De este modo, es posible comparar dichos valores críticos con valores realistas de permeabilidad a través de modelos de vesículas primitivas, y dilucidar así qué posibles restricciones pudieron suponer las distintas composiciones de membrana sobre la escala temporal de los procesos protometabólicos internos. Es destacable el hecho de que ya tan sólo un compartimento lipídico altamente permeable, como las vesículas formadas por ácido láurico (LA), podría conllevar una notable restricción sobre la escala temporal de un protometabolismo que se desarrollara en su interior (Tabla 7.1). En todo caso, conviene señalar en este punto que se han extrapolado valores de permeabilidad de membrana a carboxifluoresceína (CF) como valores de permeabilidad a nutrientes, y que las implicaciones, en cuanto a la escala temporal mínima permitida para el mantenimiento de la red de reacciones interna, quedan circunscritas al modelo particular estudiado y a la región del espacio de parámetros explorada, como ya se advirtiera en el Capítulo 7. No obstante, varios aspectos interesantes y reveladores se deducen de la comparación entre las propiedades físicas de los diferentes modelos vesiculares, como se discute a continuación.

A pesar de que normalmente la eficiencia de encapsulación se considera una medida o indicador adicional de la estabilidad de la bicapa (Maurer et al., 2009), los resultados experimentales de este estudio revelan una cierta desconexión entre la permeabilidad de la membrana y la estabilidad vesicular. Las vesículas formadas por ácido oleico y monooleína (OA/GMO) son más estables y también más impermeables a la carboxifluoresceína que las vesículas formadas por LA; ambos aspectos pueden en este caso relacionarse fácilmente con la mayor longitud de cadena hidrofóbica del OA y el GMO respecto al LA. Sin embargo, las vesículas de composición mixta constituidas por ácido láurico y monolaurina (LA/GML) y ácido láurico y dilauoil-fosfatidilcolina (LA/DLPC), son más estables que las vesículas puras de LA y en cambio resultan más permeables (Tabla 6.3). Nótese que en este caso las vesículas están

compuestas por mezclas de moléculas anfífilas de igual longitud de cadena, pero que difieren en cuanto al grado de complejidad de la cabeza polar (y la cola hidrofóbica en el caso del DLPC, que es un lípido diacílico). Todavía más significativo es el hecho de que en estas mezclas el perfil de permeabilidad respecto a la concentración relativa de GML ó DLPC es altamente no lineal, con un máximo de permeabilidad muy marcado coincidiendo precisamente con composiciones relativamente heterogéneas (Figura 6.11). El valor de la CVC sigue también una tendencia no lineal, pero con la gran diferencia de que en todo momento disminuye con el enriquecimiento progresivo en tales derivados del LA. Por tanto, ¿a qué factor responden las diferencias de permeabilidad?

Debe señalarse que el efecto estabilizante de los derivados gliceroles sobre las vesículas puras de ácidos grasos ha sido recientemente descrito (Maurer et al., 2009), así como el efecto estabilizante de derivados fosfatídicos de doble cadena (Budin y Szostak, 2011). En este último trabajo se describe además un perfil de permeabilidad que disminuye con la proporción relativa de fosfolípido, de modo consistente con las diferencias observadas en el dinamismo lipídico de la membrana (estabilidad). Los autores atribuyen así los distintos valores de permeabilidad directamente a las diferencias en el orden de empaquetamiento de la bicapa (es decir a la menor fluidez de las bicapas enriquecidas en lípidos diacílicos) (Lande et al., 1995). Aquí en cambio la tendencia de la permeabilidad es totalmente distinta. Ahora bien, los detalles moleculares también son muy diferentes, tanto en cuanto a la naturaleza del soluto¹⁰³, como en cuanto a la composición de la membrana. El modelo experimental de Budin y Szostak (2011) en verdad no está basado en mezclas binarias ácido graso/fosfolípido, sino en mezclas cuaternarias: utilizan como referencia vesículas formadas por ácido decanoico, decanol y monodecaína (DA/DOH/GMD). Se ignora así qué posibles efectos pueden tener estas mezclas más básicas sobre la permeabilidad de las vesículas puras de ácidos grasos. En este trabajo queda evidente la complejidad que entrañan ya tan sólo las mezclas binarias, y se reclama la necesidad de considerar factores distintos a los relacionados con la estabilidad, es decir distintos a la interacción entre cabezas polares y el orden de empaquetamiento¹⁰⁴.

Para comprender el perfil no lineal obtenido de dependencia de la permeabilidad con la concentración relativa de los derivados grasos, sería muy útil conocer el mecanismo de transporte de la CF a través de la membrana. Dado su tamaño (376 Da) y su carga neta negativa, es obvio que no puede atravesar la bicapa por difusión pasiva. Tal vez su transporte sea a través de poros transitorios, un fenómeno relativamente habitual en vesículas basadas en compuestos anfífilos de cadena corta (Mansy, 2010). En todo caso, como ya se señalara en el Capítulo 6, el hecho de que ambas curvas de dependencia, tanto frente a la concentración relativa de GML como de DLPC, adopten una forma parecida, sugiere que la no linealidad pueda explicarse por un mecanismo común, independiente de los detalles moleculares concretos de cada derivado. Se postula que el factor determinante puedan ser las irregularidades en la superficie de la membrana. Esto es congruente con la observación de que las muestras más permeables coinciden con aquellas mezclas

¹⁰³ Budin y Szostak (2011) eligen la ribosa como soluto para los experimentos de permeabilidad. Sin embargo, es llamativo cómo ya tan sólo la decisión de optar por un monosacárido u otro puede ser determinante en las propiedades de permeabilidad (Sacerdote y Szostak, 2005). Es razonable pues que las diferencias sean más sustanciales todavía al escoger un soluto como la CF (cargado, de mayor tamaño, etc.).

¹⁰⁴ Una revisión minuciosa permite detectar puntualmente en otros trabajos experimentales resultados en los que la permeabilidad a través de vesículas formadas por fosfolípidos es mayor que en aquellas formadas por el correspondiente ácido graso (Sacerdote y Szostak, 2005), o en los que la permeabilidad es mayor para una cierta concentración relativa de ambos (Monnard y Deamer, 2001). Por otro lado, los datos experimentales de Mansy et al. (2008) indican una gran permeabilidad en las mezclas ácido graso-derivado glicerol, en comparación con las de los ácidos grasos puros correspondientes.

en las que se estima que la fracción molar lipídica puede suponer mayor heterogeneidad en la superficie entre cabezas polares en la bicapa (Figura 6.11, inserto). Existen además evidencias previas (Mansy et al., 2008) de que tales irregularidades pueden provocar un aumento de la permeabilidad. De ser ésta la explicación, un mismo principio podría posiblemente extenderse a otras mezclas de ácidos grasos con derivados anfífilos que difirieran en la cabeza polar. Por tanto, podría idearse un escenario en el que las membranas lipídicas primitivas, en sus primeras fases de conversión, pasaran por estadios intermedios relativamente estables y permeables.

Por supuesto, es realista pensar que las membranas primitivas estarían probablemente compuestas no por mezclas binarias de lípidos, sino por combinaciones de múltiples compuestos anfífilos disponibles en el entorno. Algunos interesantes resultados de estabilidad y permeabilidad se han obtenido ya con este tipo de agregados múltiples (Cape et al., 2011). Pero sin duda, antes de pasar a analizar la permeabilidad en mezclas con más de dos componentes, todavía quedan muchos aspectos por explorar con mezclas binarias de compuestos anfífilos sencillos. La no linealidad de la permeabilidad respecto a la composición relativa de lípidos es uno de ellos. ¿Es un principio general que las vesículas formadas por mezclas de ácidos grasos con sus derivados de cabeza polar sean más permeables que las vesículas puras? ¿Pudieron haberse explotado las irregularidades en la superficie de membrana como mecanismo evolutivo para facilitar la permeabilidad con vesículas relativamente estables? Sería interesante estudiar por ejemplo la permeabilidad vesicular a distintas fracciones molares en otras mezclas (LA ó DLPC con monolauril-fosfatidilcolina, OA con monooleil-fosfatidilcolina ó POPC, etc.) para dilucidar qué mecanismos de permeabilidad intervienen en las muestras heterogéneas.

Otro factor poco explorado es la sensibilidad a la temperatura: el efecto de la temperatura sobre la estabilidad vesicular (Maurer et al., 2009), pero sobre todo su efecto sobre la permeabilidad (Mansy y Szostak, 2008). En este trabajo se han escogido como modelo de referencia de compartimento prebiótico vesículas basadas en LA. El LA es uno de los ácidos grasos saturados de cadena corta menos estudiados, a pesar de su posible disponibilidad en la Tierra primitiva, debido justamente a su alto punto de fusión. Los ensayos de liberación del encapsulado se han realizado a 45°C, bastante por encima de la temperatura de transición de fase de la bicapa (32°C), pero no se han examinado otras temperaturas. ¿Cómo afectan los cambios de temperatura al perfil de permeabilidad dependiente de composición? Monnard y Deamer (2001) por ejemplo aprovechan las imperfecciones que supone la temperatura de transición de fase lipídica para mejorar la permeabilidad de vesículas de fosfolípidos a nucleótidos. En mezclas de lípidos de distintos tipos, la situación puede ser más compleja. Si anteriormente se ha discutido cómo podría afectar la temperatura a las constantes cinéticas y el automantenimiento de una red protometabólica, sería deseable integrar esta información con el posible efecto de la temperatura sobre la permeabilidad de un compartimento prebiótico a nutrientes¹⁰⁵.

¹⁰⁵ Sin considerar las mezclas, es llamativo ya de por sí que en este estudio las vesículas puras formadas por DLPC resulten más permeables al soluto que las vesículas puras de LA, mucho más inestables. Desde luego, el grosor de la bicapa es semejante en un caso y en el otro. Tampoco la fluidez de la bicapa permite explicar las diferencias de permeabilidad: el DLPC exhibe una superficie hidrofóbica de contacto más extensa, debido a su doble cadena, de modo que facilita las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals con moléculas vecinas, y en definitiva, el orden de empaquetamiento (como queda reflejado por su mayor estabilidad en términos de CVC). En lo que se refiere al tamaño de la cabeza polar lipídica, el DLPC tiene una cabeza más voluminosa, por lo que su dinámica de *flip-flop* está más desfavorecida. Si el mecanismo de transporte del soluto fuese mediado por *flip-flop*, más bien se esperaría mayor permeabilidad a través de las membranas de LA, lo cual no es el caso. Pero tal vez las diferencias de permeabilidad entre los dos tipos vesiculares sí puedan explicarse en términos del tambaleo molecular motivado por la temperatura relativamente alta: Los “bloques” de DLPC son más voluminosos que los de LA y su tambaleo en la bicapa podría conllevar defectos

También sería conveniente, puesto que la CF no es una molécula de relevancia prebiótica, analizar el comportamiento con otros compuestos que pudieran haber servido como nutrientes primitivos, como monosacáridos, aminoácidos o mononucleótidos. Éstos se ajustarían mejor a la naturaleza de los precursores del modelo protometabólico compartimentado. La CF es, no obstante, un adecuado punto inicial de referencia, ya que es fácil de cuantificar, y por sus dimensiones y carga, probablemente ofrece una estimación a la baja de la velocidad de paso de la mayoría de nutrientes que hubieran podido abastecer a los primeros protometabolismos. Es de esperar que la permeabilidad de un nutriente prebiótico fuese algo mayor que la de la CF, y por tanto que el límite sobre la escala temporal de los procesos protometabólicos internos fuese algo menos restrictivo que como se indica en la Tabla 7.1. Pero tanto la carga, como la forma y el tamaño del soluto condicionarían bastante su permeabilidad. Además, un mismo soluto podría explotar diversas características propias según atravesase una membrana de uno u otro tipo (por ejemplo, la carga neta negativa de las vesículas de ácidos grasos pudo favorecer más el paso de unos solutos frente a otros), por lo que en realidad sería ineludible valorar cada pareja membrana-soluto específicamente.

Con independencia de los detalles anteriores, existiría todavía una cuestión más elemental a resolver en lo referente al papel restrictivo de la permeabilidad del compartimento prebiótico sobre la viabilidad de los procesos protometabólicos encapsulados. Se ha valorado esencialmente el problema que supone una accesibilidad limitada de nutrientes a través de la bicapa para el correcto funcionamiento metabólico. Se deduce que aquellas combinaciones de lípidos que confieren mayor permeabilidad a la membrana facilitarían la entrada de nutrientes y serían más favorables para permitir un metabolismo más rápido (Tabla 7.1). Pero no se ha contemplado el posible problema que supondría un compartimento demasiado permeable para la correcta retención de los intermediarios metabólicos. Es razonable que una alta permeabilidad también pudiera conllevar mayor riesgo de pérdida de los metabolitos internos¹⁰⁶. Por tanto, ¿sería verdaderamente ventajosa la mayor permeabilidad que ofrecen las vesículas mixtas con derivados grasos de distinto tamaño de cabeza polar? Es decir, ¿es asumible la hipótesis de semipermeabilidad de los compartimentos primitivos, permeables a nutrientes pero no a metabolitos?

Numerosos experimentos demuestran la capacidad de las vesículas basadas en ácidos grasos para retener biopolímeros en su interior y permitir al mismo tiempo el paso de monómeros o pequeñas moléculas a su través (Walde et al., 1994b; Mansy et al., 2008; Maurer et al., 2009). Por ejemplo, en este último trabajo se describe la capacidad tanto de las vesículas de LA como de LA/GML en proporción molar 2:1 de retener una pequeña molécula de tRNA durante horas (y liberar en cambio relativamente rápido la CF). Ahora bien, los constituyentes de los primeros protometabolismos serían más bien pequeños oligómeros funcionales de tamaño más cercano al de los posibles precursores. Aunque existen pocos estudios de permeabilidad diferencial con dímeros, trímeros, tetrameros, etc., Monnard y Deamer (2001) obtienen interesantemente (eso sí, con vesículas de fosfolípidos) permeabilidades selectivas a mononucleótidos: valores de permeabilidad

transitorios más notables en la región hidrofóbica. El LA se adaptaría mejor a los pequeños espacios libres transitorios. Pero en definitiva, ¿qué sucedería a otras temperaturas?

¹⁰⁶ En lo que se refiere al trabajo teórico-computacional, uno de los aspectos que podría explorarse en un futuro, es el efecto de incluir explícitamente en el modelo protometabólico compartimentado la pérdida de los metabolitos por liberación a través de la membrana. En ausencia de datos experimentales, la velocidad de pérdida podría ser proporcional a la permeabilidad de membrana a metabolitos. Seguramente, el diagrama de bifurcación de la Figura 7.3 adoptaría en tal caso forma de meseta, con un estado de automantenimiento limitado tanto por valores de permeabilidad muy bajos (escaso abastecimiento de nutrientes) como por valores de permeabilidad muy altos (pérdida excesiva de metabolitos).

relativamente altos a ATP, pero una total impermeabilidad al dinucleótido, AU. Quizá en este sentido es esencial distinguir entre la estabilidad y la permeabilidad del compartimento. A partir de unas ciertas características, es posible que los solutos no puedan abandonar las vesículas por ninguno de los mecanismos de transporte descritos para las bicapas lipídicas (Mansy, 2010), sino que precisen verdaderamente la ruptura de la membrana. En tal caso, la permeabilidad selectiva sería una propiedad intrínseca a las membranas lipídicas, y vesículas primitivas altamente permeables pero suficientemente estables, como las formadas por mezclas de LA/GML ó LA/DLPC, serían seguramente óptimas para el desarrollo del protometabolismo.

En síntesis, los resultados experimentales de este estudio sugieren dos etapas bien diferenciadas en la evolución temprana de la membrana (Figura 9.3): En una primera fase de conversión, las membranas de ácidos grasos (y otros compuestos anfifílicos de cadena corta que estuvieran disponibles en el entorno) se habrían enriquecido en compuestos derivados relativamente sencillos de síntesis endógena, de longitudes semejantes a las de los lípidos prebióticos precursores, pero de diverso grado de complejidad de la cabeza polar. Durante esta etapa, la membrana habría podido ensayar combinaciones de lípidos ventajosas, que habrían imprimido mayor estabilidad al compartimento y también una mayor permeabilidad. Por ejemplo, la producción de derivados glicerolés o derivados fosfolipídicos de cadena corta pudo haber sido beneficiosa, como se intuye a partir de las propiedades físicas de las vesículas de composición mixta formadas por LA/GML y LA/DLPC. Estos cambios posibilitarían la mejora de la actividad metabólica, es decir el desarrollo de metabolismos más rápidos y eficientes, que posiblemente dotarían a estos sistemas de composición mixta de ventajas selectivas.

En una fase posterior de transformación de la membrana, se habrían comenzado ya a sintetizar lípidos de mayor longitud y tamaño, que habrían conferido todavía mayor estabilidad y robustez al compartimento, pero que inevitablemente habrían provocado una fuerte impermeabilización de la bicapa, al ser muy hidrófobos y ensamblar además en estructuras muy ordenadas. Esta combinación de alta estabilidad e impermeabilidad es la que se observa con las vesículas lipídicas formadas por OA/GMO. Para evitar un fuerte efecto restrictivo sobre la escala temporal de la red de reacciones interna, que truncara el progreso del metabolismo, debieron de hacer falta entonces nuevos mecanismos compensadores para potenciar la permeabilidad selectiva a nutrientes. Es decir, se habría hecho imprescindible la coevolución de maquinaria de transporte más específico (por ejemplo basada en péptidos (Oliver y Deamer, 1994)) para asegurar el correcto aprovisionamiento de nutrientes y facilitar el desarrollo de metabolismos más complejos, con catalizadores progresivamente más eficientes¹⁰⁷.

¹⁰⁷ También podría haber sucedido “al revés”: una conversión inicial de la membrana hacia ácidos grasos de mayor longitud y posteriormente un progresivo aumento en la complejidad de la cabeza polar lipídica. Pero de ser así, la producción de péptidos u otros compuestos reguladores de la permeabilidad habría sido necesaria desde el mismo comienzo. Aquí la inclinación es más bien por la otra opción. Por un lado, seguramente no hubiera requerido mecanismos catalíticos tan complicados inicialmente (no es comparable *el ataque a un grupo carboxilo con la adición de grupos acetilos* – previamente activados – sobre la cadena hidrocarbonada). Y por otro lado, las propiedades físicas de las vesículas basadas en ácidos grasos de cadena corta se modulan más efectivamente a través de interacciones entre las cabezas polares que a través de las interacciones hidrofóbicas entre las colas hidrocarbonadas (Maurer et al., 2009). Así, el efecto estabilizante sería seguramente más notorio inicialmente con derivados de la cabeza polar que con ácidos grasos algo más largos. Es con los ácidos grasos de cadena larga con los que las interacciones hidrofóbicas ya toman más peso y son más determinantes en las propiedades de estabilidad.

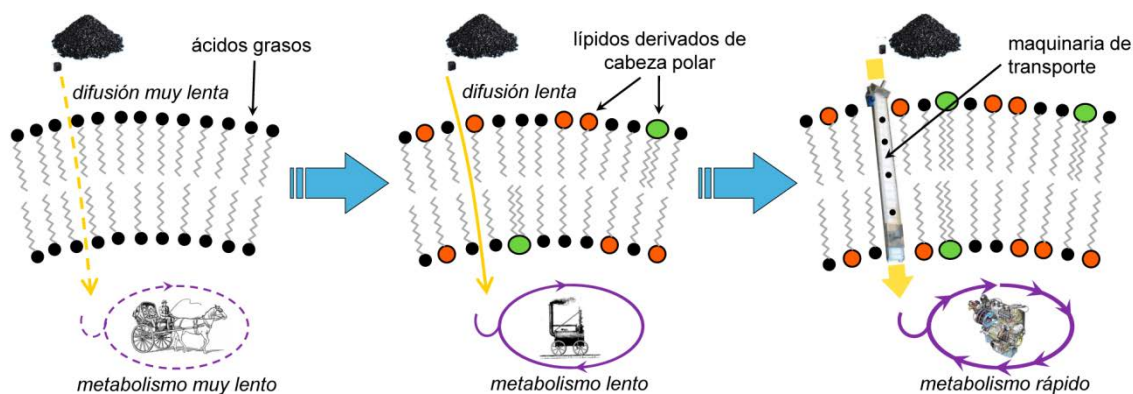


Figura 9.3 Escenario propuesto de coevolución temprana del compartimento y el metabolismo. Durante las primeras fases de desarrollo protocelular, las membranas prebióticas habrían podido enriquecerse en derivados lipídicos de síntesis endógena, algunos de los cuales pudieron haber contribuido en la formación de compartimentos de composición mixta ventajosos, relativamente más estables y más permeables a nutrientes. A medida que los catalizadores (metabolismo subyacente) se fueran haciendo progresivamente más eficientes, la membrana tuvo que combinar el aumento en su estabilidad y complejidad lipídica (que le fuera confiriendo robustez) con mecanismos ya más específicos para mejorar la permeabilidad a nutrientes, por ejemplo a través de la inserción en la bicapa de maquinaria de transporte específico.

En todo caso, una idea central subyace en los argumentos expuestos a lo largo de este apartado (Szathmáry, 2007): no es muy conveniente tratar por separado los problemas que pudieran involucrar al protometabolismo de aquellos que pudieran afectar a las propiedades del compartimento. Es preciso contemplar un escenario de coevolución para el desarrollo de los compartimentos en estrecha sintonía con el desarrollo y perfeccionamiento de los procesos de catálisis. El metabolismo debió quedar alojado muy tempranamente en compartimentos vesiculares, y a continuación, ambos debieron seguir dinámicas progresivamente más interdependientes y complejas. Esto, de hecho, da pie a un cambio de perspectiva importante en lo que sigue: el compartimento, que hasta este punto se ha discutido como una restricción física externa al sistema, va a pasar a *integrarse* en él, a ser parte constitutiva del mismo. Con las sucesivas transformaciones de las membranas primitivas se ofrece un paso a un nivel de organización mayor, más integrador, en el que el compartimento quedaría acoplado con la red de reacciones interna, cuya dinámica resulta por tanto imprescindible analizar a nivel global.

9.3 Origen del metabolismo vectorial: un nuevo paso hacia la organización biológica

Más allá del fenómeno temprano de encapsulación, el acoplamiento químico entre el compartimento y el metabolismo subyacente debió ser en efecto un hito fundamental en la consecución de la organización biológica. Todos los organismos vivos conocidos son celulares y presentan por ello un metabolismo *vectorial* (Harold, 1991). Al margen del control cinético que ejercen los catalizadores sobre los procesos de reacción, y que permite instruirlos y orientarlos hacia formas recursivas de autoproducción, existen procesos que aprovechan las heterogeneidades espaciales, tales como gradientes, fenómenos de difusión y transporte de compuestos a través de membrana, procesos que suceden en subespacios compartimentados diferentes, todos ellos fuertemente entrelazados con la red de transformaciones químicas regulada por catalizadores. El desarrollo de estas otras formas de control espacial debió volverse significativo sólo a partir del momento en el que el protometabolismo pasara a hacerse cargo de ciertas de las propiedades del

compartimento; es decir, sólo en la medida en la que los componentes de membrana comenzaran a ser modificados o producidos de modo endógeno desde la propia red de reacciones protometabólicas.

Como ya fue señalado al comienzo del Apartado 8.4, la autoproducción de la membrana marca el inicio de una nueva fase de organización protocelular de mayor complejidad. Si hasta entonces el compartimento se contemplaba como una limitación externa, ahora pasa a formar parte, en sentido estricto, de la organización del sistema. Un compartimento biológico (más propiamente, la membrana citoplasmática) marca la asimetría necesaria para considerar a un lado “algo vivo” y a otro lado algo “no vivo”, pero además resulta ser en sí mismo una estructura funcional que reside en la propia organización del sistema vivo, y que es clave para preservar este último como una organización distinguida del entorno. Es un hecho plenamente contrastado el que todos los organismos vivos construyen su propia frontera física (en última instancia, a través de rutas biosintéticas de componentes de membrana citoplasmática) y sólo se mantienen en el contexto de ésta. Esto es precisamente en lo que insiste la teoría de la autopoiesis (Varela et al., 1974), que enfatiza la necesidad en todo sistema biológico de un determinado compartimento producido por unas reacciones de producción que suceden en su interior, que defina los límites del sistema y posibilite las condiciones para que ese conjunto de reacciones internas, de hecho, se mantenga operativo.

Al mismo tiempo, no conviene olvidar que el compartimento, al mismo tiempo, establece un nexo de unión con el entorno. La síntesis endógena de componentes de membrana debió proporcionar al sistema la posibilidad de modular, *desde dentro*, el modo en el que relacionarse con el medio externo circundante. La membrana de las células actuales presenta una compleja maquinaria proteica, y juega un papel esencial en el control del transporte y en procesos de transducción de energía. Esto, efectivamente, se refleja en la universalidad de los mecanismos bioenergéticos (Skulachev, 1992): i. Los seres vivos no utilizan la energía tal como se presenta en el entorno; siempre la transforman en sus propias monedas energéticas. ii. Estas monedas son de dos tipos: química (ATP, NADH, etc.) y quimiosmótica (gradientes de potencial electroquímico a través de la membrana). iii. Ambas monedas son esenciales, si bien interconvertibles; el acoplamiento con la fuente de energía externa puede realizarse bien mediante la producción de uno o el otro tipo de moneda. Con mecanismos mucho más rudimentarios, un sistema protocelular autoproductivo pudo haber adquirido ya un cierto grado de control sobre sus procesos constitutivos, a través de la producción e inserción en membrana de compuestos como pequeños péptidos o hidrocarburos aromáticos policíclicos sencillos, que ya no sólo modificaran las propiedades dinámicas y físicas de la bicapa lipídica, sino que también pudieran otorgar nuevas funcionalidades al compartimento (Ruiz-Mirazo y Moreno, 2004; Ruiz-Mirazo y Mavelli, 2008). Esta posibilidad, que pudo contribuir en una mayor autonomía e independencia protocelular de las condiciones de contorno, está sin embargo todavía poco explorada¹⁰⁸.

¹⁰⁸ Cabe mencionar algunos trabajos pioneros que ya se han realizado en la línea de la funcionalización de los compartimentos primitivos (Pohorille y Deamer, 2009). Se ha descrito por ejemplo cómo péptidos hidrofóbicos pueden formar canales en la bicapa que favorecen selectivamente la permeabilidad a protones (Oliver y Deamer, 1994). También se conoce la capacidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de actuar como pigmentos fotoexcitables transductores de energía lumínica; inducen reacciones fotoquímicas y generan, una vez insertados en la membrana, gradientes de protones a través de la bicapa (Deamer, 1992; Cape et al., 2011). Muy recientemente, también se ha demostrado el papel funcional de un dipéptido que mejora el orden de empaquetamiento en la bicapa, favoreciendo la adquisición de lípidos y el crecimiento en experimentos de competición vesicular (Adamala y Szostak, 2013).

En el Apartado 8.4 se ha realizado un estudio preliminar de las posibilidades dinámicas que pudo ofrecer un sistema protoceular plenamente autoprodutivo. Como primera medida, se ha considerado un escenario de acoplamiento relativamente sencillo, en el que el protometabolismo interno es capaz de producir un tipo de lípido que se inserta en la bicapa de la membrana preformada. Así pues, aunque el lípido derivado de síntesis pueda permitir cierta modulación de las propiedades del compartimento, el modelo está todavía desprovisto de otros mecanismos propios más específicos de control de las condiciones de contorno. La cuestión que se plantea es: ¿qué beneficios o perjuicios pudo reportar la consecución de un proceso de síntesis endógena de lípidos en tales fases tempranas de desarrollo protoceular? ¿Pudo establecerse una organización autoprodutiva de este tipo en ausencia todavía de otros componentes capaces de un control más específico sobre el transporte y procesos de flujo, involucrando sencillamente a lípidos en la adquisición de una membrana funcional? ¿O más bien debió requerir ya de metabolismos en estadios más avanzados, que compaginaran la producción de lípidos con la de moléculas adicionales (como péptidos) para construir un compartimento funcional que garantizase la estabilidad?

En algunos estudios previos al de este trabajo (Piedrafita et al., 2011; Ruiz-Mirazo et al., 2011) exploramos ya, con el uso de la plataforma ENVIRONMENT, las posibles repercusiones de la transición entre una vesícula autoensamblada con lípidos disponibles en el entorno y una protocélula autoprodutiva, capaz de sintetizar un lípido derivado más complejo. El principal foco de atención se situó en analizar el posible efecto de los cambios en la composición y propiedades de la membrana lipídica sobre la viabilidad global del sistema protoceular. La gran acumulación interna de subproductos de desecho, derivada de la fuerte impermeabilización producida con la conversión de la membrana, se describía entonces como una importante limitación, debido al correspondiente riesgo de colapso por choque osmótico. Con ello, se vislumbró la dificultad de alcanzar organizaciones autoprodutivas estables en ausencia de mecanismos relativamente específicos de control osmótico o de permeabilidad. Esta opción, en la que la conversión de la composición lipídica de las membranas prebióticas hacia lípidos más complejos de síntesis habría de haberse acompañado necesariamente de mecanismos adicionales para facilitar el transporte de solutos a través de la bicapa, es la que han adoptado claramente otros investigadores (Budin y Szostak, 2011).

No obstante, en esos estudios previos de simulación que realizamos, las consideraciones sobre las propiedades físicas de la bicapa lipídica no eran aún muy realistas (por ejemplo, se suponía una dependencia lineal de la permeabilidad con la concentración relativa de lípido complejo). Por otro lado, la red interna de reacciones protometabólicas consistía en un único ciclo de autocatálisis, operando, de hecho, en régimen totalmente autocatalítico. Este tipo de esquema metabólico demostró ser bastante inflexible: suponía una rápida conversión total de la membrana, y difícilmente armonizaba con situaciones estacionarias de coexistencia de ambos lípidos (prebiótico y de síntesis) en la bicapa¹⁰⁹. Por todo ello, el modelo semiempírico desarrollado en el presente trabajo, que presenta un control cinético sobre los procesos de reacción más atemperado, se configura como una alternativa más adecuada para analizar la cuestión de la génesis de una organización protoceular plenamente autoprodutiva (en ausencia de mecanismos específicos de control de flujos transmembrana).

¹⁰⁹ Tan sólo mediante algunos mecanismos particulares se podía evitar con este esquema y presupuestos una transición demasiado rápida hacia membranas más impermeables que expusiera al sistema a problemas osmóticos; por ejemplo, con la participación del lípido prebiótico inicialmente disponible en la síntesis del lípido complejo, de manera que la potencia de la red metabólica, basada en un ciclo autocatalítico simple *a la* Gánti, pudiera ser al menos parcialmente regulada (Ruiz-Mirazo et al., 2011).

El sistema protoceular modelo presentado en la Figura 8.16 puede colapsar tanto por causas celulares (choque osmótico) como por causas metabólicas (autosofoco). Sin embargo, ambos tipos de efectos están en realidad relacionados con el balance entre la eficacia de operación del protometabolismo y la permeabilidad del compartimento, de tal forma que en cierta medida se compensan. Esto, ya de por sí, permite al sistema contar con un cierto grado de control sobre su estabilidad dinámica: la velocidad limitada de adquisición de nutrientes a través de la membrana preformada modera la velocidad de producción de subproductos metabólicos osmóticamente activos, y por tanto su acumulación interna, reduciendo el riesgo de un choque osmótico. Por otro lado, es interesante destacar que la producción endógena de lípido conlleva, para un amplio rango de valores de los parámetros (siempre y cuando las escalas de tiempo a las que operen las reacciones sean suficientemente largas y los valores de permeabilidad de membrana a solutos relativamente altos), la consecución de un régimen autorreproductivo. Este régimen de divisiones es relativamente robusto y puede perpetuarse en el tiempo de manera estable, si bien para ello se precisa, curiosamente, también la acumulación continuada de al menos uno de los subproductos metabólicos en el interior del compartimento. Se da por tanto la situación paradójica de que una sobrecarga en productos de desecho sería perjudicial, pero una suave acumulación neta de alguno de ellos no sólo no sería problemática, sino que se tornaría conveniente.

La acumulación neta continuada de alguno de los subproductos de desecho del protometabolismo pudo ser factible si alguna de estas especies fuese lo suficientemente impermeable para no ser liberada al medio externo a través de la membrana. En realidad, esto no necesariamente implica que tales moléculas hubieran de haber sido oligoméricas o de mayor tamaño que los nutrientes permeables. En el esquema desarrollado (Figura 8.16), un proceso último de polimerización de los monómeros inactivos producidos por degradación de SU parece una opción poco plausible. Más probablemente Z podría representar un estado de agregación (unión no covalente) de dichas moléculas inactivas. Tal vez una estructura supramolecular de ese tipo pudo haber quedado retenida y ejercer la presión osmótica necesaria para incentivar el crecimiento del volumen protoceular, aunque fuese de modo un tanto burdo o precario¹¹⁰. En todo caso, conviene señalar que este requerimiento osmótico para la proliferación protoceular sostenida está condicionado por los presupuestos de simulación, y en concreto por la condición de división impuesta por ENVIRONMENT (Apartado 11.3.3 de Material y Métodos). Aunque es razonable termodinámicamente una condición de división determinada por la energía de curvatura de la membrana y la relación superficie/volumen protoceular, en la práctica existe una diversidad muy amplia de condiciones experimentales en las que se observan fenómenos de fisión vesicular (Hanczyc y Szostak, 2004; Zhu y Szostak, 2009). Así, uno de los aspectos imprescindibles que deberá seguir siendo estudiado para la elaboración de modelos celulares mínimos realistas es cómo conseguir condiciones para una reproducción fiable, que comporte una coordinación metabolismo-membrana.

Al margen de los problemas que plantea una división fidedigna, fiel, en condiciones experimentales reales, el modelo protoceular autoproduktivo de este trabajo exhibe un régimen reproductivo relativamente robusto bajo los supuestos generales contemplados para la modelización del compartimento. Esto apunta a que un sistema de este tipo pudo haberse desarrollado durante fases tempranas de complejización protoceular, aun a pesar de no disponer

¹¹⁰ Tal escenario hipotético, en el que los productos de desecho adquirirían cierta funcionalidad primaria a través de la formación de agregados impermeables poco definidos, habría podido dar paso más tarde a otro en el que, ya sí, habrían surgido mecanismos más sofisticados, instruidos activamente por el metabolismo, para controlar de modo más fino el crecimiento del volumen protoceular – por ejemplo a través de la reconducción de procesos de catálisis hacia la polimerización de algunos “residuos” osmóticamente activos.

de mecanismos específicos de control de las condiciones de contorno. Con muy diversas cinéticas de producción del compuesto Z y el lípido de síntesis, se alcanza una estacionariedad en la reproducción, caracterizada en cada caso por valores semejantes de superficie de membrana S_m , volumen intracelular V_{in} , tiempo de vida generacional Δt_g y concentraciones de intermediarios metabólicos con las sucesivas divisiones (Figuras 8.14 y 8.15). Esto es algo que ya se ha observado con otros modelos analizados con la plataforma ENVIRONMENT (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2013). Sin embargo, aunque estos autores ya han realizado un primer esfuerzo por determinar analíticamente las condiciones *en* el régimen de reproducción estacionario, todavía falta por analizar en detalle cuáles son las condiciones, los límites de los parámetros, *para* la consecución de dicho régimen. Para ello puede ser muy útil un estudio analítico que evalúe la estabilidad. ¿Qué hace que la reproducción estacionaria sea un atractor aparentemente tan estable?

Otro aspecto a destacar del régimen de divisiones obtenido con el modelo es que se efectúa con la homeostasis de las concentraciones internas de los distintos metabolitos. Es una característica diferencial muy importante respecto a otros modelos protoceulares que optan tradicionalmente por esquemas de reacción operando con una cinética fuertemente autocatalítica (con crecimiento exponencial o hiperbólico de sus componentes) (Rocheleau et al., 2007). Como ya se ha apuntado antes, una dinámica basada en el crecimiento continuo de la concentración de todos los intermediarios presenta, en el contexto de un compartimento lipídico sensible, el problema de un difícil control (Ruiz-Mirazo et al., 2011). Al mismo tiempo, una cinética autocatalítica tarde o temprano queda limitada por la concentración disponible de precursores (King, 1978). Si a esto añadimos el hecho de que en las células actuales el metabolismo opera fundamentalmente de forma estacionaria, resulta evidente que un modelo protoceular en el que el metabolismo transcurre de modo más apaciguado puede ser una aproximación más acertada¹¹¹.

En este punto, conviene distinguir entre la importancia de una estructura (estequiométrica) autocatalítica, y una cinética autocatalítica. Precisamente, en las células actuales la herencia génica, de carácter replicativo, es fundamental. Pero además, algunos autores (Kun et al., 2008) han identificado múltiples metabolitos comunes que actúan en el metabolismo como autocatalizadores obligados, que no pueden ser producidos si no es gracias a su propia intervención previa. Habitualmente éstos operan de modo estacionario y quedan inadvertidos, pero constituyen la base de una “*herencia metabólica*”. No es propósito de esta discusión defender que estos mismos metabolitos pudieran representar reliquias de los primeros protometabolismos (es cuestionable trasladar, como pueden hacer los autores, el asunto hasta tal extremo), pero sí puede argumentarse que las primeras organizaciones prebióticas (protoceulares) pudieron haber explotado un tipo de herencia metabólica similar, y haberse desarrollado sobre estructuras autocatalíticas parecidas operando estacionariamente.

Por último, es interesante reparar en las implicaciones dinámicas que pudieron haber acarreado los primeros cambios en la composición lipídica de la membrana primitiva, producidos como consecuencia de la sustitución de lípidos prebióticos por lípidos de síntesis endógena relativamente más complejos. En la sección previa de la Discusión se ha postulado que un enriquecimiento temprano en derivados gliceroles o fosfolipídicos de ácidos grasos de cadena corta

¹¹¹ Como ya se señalara, el compartimento protoceular es relativamente robusto frente a la pérdida de metabolitos (Figura 8.11), lo cual constituye un aspecto muy interesante: permite defender que la vesícula considerada pudo ser un compartimento suficientemente polivalente para acoger otros tipos de metabolismo distintos al que aquí se ha considerado, con otras concentraciones de metabolitos características u otras dinámicas (por ejemplo oscilantes). Pero en cualquier caso, aunque no llega a desestabilizarse con el colapso del protometabolismo, debemos reconocer que sí puede romperse (por crisis osmótica) si el metabolismo es demasiado potente.

pudo haber sido beneficioso, ya no sólo por conferir mayor estabilidad al compartimento, sino por mejorar su permeabilidad y favorecer así el desarrollo de protometabolismos internos operando a escalas de tiempo más cortas (procesos reactivos más rápidos). Pero el análisis cinético completo del sistema protoelular autoprodutivo revela que la conversión hacia estas membranas de composición mixta más permeables habría sido además ventajosa por permitir, para iguales escalas de tiempo de los procesos protometabólicos, mayores concentraciones internas de los metabolitos y un tiempo más corto entre divisiones consecutivas en el régimen de autorreproducción (Figura 8.18). Estas diferencias en la velocidad de replicación ligadas a las diferencias de permeabilidad significan que la permeabilidad habría podido jugar un importante papel como propiedad selectiva primitiva en los primeros sistemas protoelulares autoprodutivos. En un escenario de competición *a la Szostak*, se habrían impuesto las protocélulas capaces de mantener membranas de composición mixta más permeables, dotadas de mayor ventaja selectiva.

La permeabilidad cambia de forma fuertemente no lineal con la composición lipídica de la membrana y el máximo se registra coincidiendo con mezclas heterogéneas de coexistencia en la bicapa de lípido prebiótico y lípido de síntesis. Así pues, el desarrollo de mecanismos de control para modular la producción endógena del lípido complejo y garantizar una composición mixta de la bicapa pudo tornarse crucial en esta fase de desarrollo de un metabolismo vectorial. Una vez más, un metabolismo muy potente (fuertemente autocatalítico) no habría sido necesariamente la mejor opción (habría supuesto una rápida conversión total de la membrana); un metabolismo con un adecuado control cinético sí habría podido favorecer una conversión de la membrana parcial y habría sido tal vez más conveniente. En todo caso, es importante ser conscientes de que las derivaciones que puedan hacerse a partir del modelo semiempírico protoelular contemplado en esta Tesis son todavía muy limitadas. Nos hemos centrado en el papel preponderante de la permeabilidad de la membrana, pero indudablemente, para obtener una mejor comprensión de las condiciones de viabilidad y las posibilidades dinámicas que pudo ofrecer el escenario de una protocélula plenamente autoprodutiva, sería deseable profundizar más en los cambios físico-químicos producidos con la conversión de la membrana, y seguir considerando, en la medida de lo posible, parámetros realistas de mezclas lípido prebiótico-lípido de síntesis.

Entre los diversos aspectos que sería conveniente tratar o implementar en futuros estudios de modelización protoelular está el autoensamblaje de vesículas *de novo*¹¹², la tolerancia a la fisión y la máxima tensión osmótica en compartimentos formados por mezclas de lípidos sencillos, valores cinéticos realistas de catálisis de producción de lípidos dentro de vesículas, el posible efecto de la presión osmótica vesicular sobre su permeabilidad de membrana, o la dependencia de algunos parámetros relacionados con la estabilidad vesicular (como la fluidez de la bicapa y la concentración crítica para la formación de vesículas o CVC) con la concentración relativa de lípidos en membrana. Algunas de estas propiedades distintas a la permeabilidad y que pudieron variar con la composición lipídica de membrana han sido descritas como fuente de presión selectiva en otros trabajos y resaltadas por su posible interés para comprender las primeras transiciones evolutivas protoelulares. Es el caso de la presión osmótica intracelular (Chen et al., 2004), el tamaño del compartimento (Cheng y Luisi, 2003) o la dinámica de liberación e incorporación de compuestos anfífilos en membrana (Budin y Szostak, 2011; Adamala y Szostak, 2013). La integración de estos mecanismos en el modelo protoelular aquí desarrollado contribuirá a obtener dinámicas más realistas y mejorar el entendimiento sobre la interrelación entre el metabolismo y la membrana primitivos. Sólo una vez caracterizado y asimilado el tipo de

¹¹² ENVIRONMENT todavía requiere como condición inicial comenzar con compartimentos preformados, pero esta nueva posibilidad del autoensamblaje de vesículas *de novo* abriría la puerta a analizar la transición prebiótica completa en la síntesis de una protocélula autoprodutiva.

interacciones presentes en estas primeras fases de consolidación de un sistema protocelular relativamente autónomo – así como el nivel de integración funcional y robustez dinámica al que daría lugar – tiene realmente sentido abordar otros problemas, también de gran calado biológico, como el origen de los componentes informativos y de la capacidad de evolución abierta, que muy probablemente requirieron mecanismos moleculares y formas de organización metabólica de mucha mayor complejidad.

Capítulo 10

10 Conclusiones

A continuación se exponen las principales conclusiones del estudio realizado y que configuran la presente Tesis doctoral:

1. Un sistema relativamente sencillo de reacciones químicas capaz de producir sus propios catalizadores puede ser capaz de autoconstruirse y mantenerse operativo en un régimen de concentraciones no nulas de sus constituyentes, a pesar de la continua degradación y pérdida de los catalizadores. La relativa robustez dinámica y estructural de este sistema *autoconstrutivo* permite proponerlo como un modelo plausible de protometabolismo.
2. El volumen de confinamiento y la velocidad limitada de adquisición de nutrientes a través de una membrana son factores críticos potenciales para el desarrollo de una red de reacciones químicas autoproductiva en el interior de un compartimento vesicular. La escala temporal o velocidad de reacción de los procesos protometabólicos incipientes debió de quedar limitada por la permeabilidad de los compartimentos primitivos a nutrientes prebióticos disponibles en el entorno.
3. Ciertos compuestos anfifílicos sencillos, como monoacil-glicerol o monoacil-fosfoglicéridos, confieren estabilidad y al mismo tiempo mayor permeabilidad a vesículas de composición pura formadas por ácidos grasos de cadena corta de posible relevancia prebiótica. Por ello, la producción endógena de este tipo de derivados lipídicos pudo, en un escenario de evolución prebiótica, proporcionar un mecanismo primitivo de control de la permeabilidad, favorable para el desarrollo de procesos metabólicos internos más rápidos y eficientes.
4. El acoplamiento químico entre un metabolismo autoproductivo y el compartimento vesicular que lo envuelve, establecido por medio de un proceso interno de síntesis y control de componentes de membrana, posibilita la consecución de dinámicas globales autorreproductivas. Este régimen es robusto y accesible en un amplio rango de condiciones, al menos computacionalmente. La emergencia de una organización protocelular con estas características debió ser cardinal como “plataforma” flexible para la construcción posterior de niveles crecientes de complejidad, en un escenario caracterizado por la coevolución del metabolismo y la membrana.

5. Para poder progresar en el entendimiento del origen y primeras fases de evolución de la vida, se hace indispensable conciliar los requerimientos conceptuales organizativos con modelos cinéticos compatibles con las restricciones físico-químicas de un contexto prebiótico realista. La combinación de metodologías teórico-computacionales y experimentales, siguiendo una aproximación semiempírica, se muestra como una estrategia con gran potencial para futuras aportaciones en el campo de estudio del origen de la vida.

Capítulo 11

11 Material y métodos

11.1 Metodología experimental

11.1.1 Materiales

Los siguientes reactivos se han adquirido de Fluka (Suiza): ácido láurico, ácido oleico, 1-dodecanol, 5(6)-carboxifluoresceína, Rojo Nilo, bicina, hidrato de sal de sodio de ácido cólico, y Triton X-100. De Sigma (USA) se ha obtenido: *rac*-1-lauroilglicerol, 1-oleil-*rac*-glicerol, 1,2-didodecanoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina, merocianina 540, octil- β -D-glucopiranosido, y dodecilsulfato de sodio.

11.1.2 Preparación de vesículas lipídicas

Las suspensiones vesiculares se han preparado añadiendo los compuestos anfifílicos, ya fundidos (en estado líquido), sobre una solución de tampón bicina 100 mM, y siguiendo el método de vesiculación inducida por pH (Monnard y Deamer, 2003): Primeramente se procede incrementando progresivamente el pH, con sucesivas adiciones de alícuotas de NaOH, hasta conseguir que la muestra se vuelva totalmente transparente (hacia pH 9 ó 10). De esta manera se consigue maximizar la solubilidad del ácido graso, que a pH alcalino predomina en su forma ionizada o desprotonada. Y a continuación la muestra se acidifica poco a poco añadiendo HCl, hasta alcanzar un pH final próximo al pK_a aparente del ácido graso, para el que la estabilidad de las estructuras vesiculares es óptima y se favorece su formación. La presencia de vesículas se corrobora a través del microscopio de fluorescencia (Eclipse TE2000-S, Nikon), usando el colorante lipofílico Rojo Nilo. El valor de pH final escogido para cada sistema experimental, así como la temperatura de preparación y otros detalles particulares se describen en el texto (Apartado 6.1.1).

11.1.3 Determinación de la concentración crítica de agregación vesicular (CVC)

La CVC se ha determinado a través de ensayos con merocianina 540. Este es un compuesto fluorescente que puede presentarse tanto en forma monomérica como formando dímeros, y cuyo espectro de absorbancia depende del medio en el que se encuentra. El máximo de absorción se produce a 530 nm cuando el entorno próximo al cromóforo es un medio acuoso, pero se desplaza a 570 nm cuando la molécula se localiza en un ambiente hidrófobo como el del interior de las bicapas lipídicas (Sato et al., 2000). La absorbancia a 530 nm y a 570 nm se ha medido en un espectrofotómetro (Lambda 35, Perkin Elmer) para varias diluciones seriadas de la suspensión vesicular. La concentración de lípido a la cual se detecta un aumento en el valor del cociente Abs_{570}/Abs_{530} se determina como la CVC.

11.1.4 Encapsulación del soluto y análisis de su liberación

Se han preparado suspensiones vesiculares siguiendo el método de vesiculación inducida por pH anteriormente descrito, con la particularidad de que la dispersión se realiza sobre una solución de tampón bicina 100 mM que contiene el soluto a encapsular, la carboxifluoresceína (CF). A continuación, las vesículas se han extruido con un pequeño extrusor de Avanti Polar Lipids (USA), haciendo pasar la muestra 21 veces a través de filtros de policarbonato. El análisis de la suspensión con un aparato de dispersión dinámica de luz o DLS (Precision Detectors) ha servido para comprobar la formación de poblaciones monodispersas de vesículas del tamaño deseado.

La CF no encapsulada se ha retirado por cromatografía de exclusión molecular. Para ello se ha utilizado una columna de agarosa al 5.9% (Bio-Gel A1.5, Biorad) previamente equilibrada con tampón bicina 100 mM al pH correspondiente de la muestra. Con estas características, el límite de exclusión es 1500 kDa y el rango de operación 10 – 1500 kDa. La muestra eluida se colecta en fracciones de 500 μ L. La fracción de elución con mayor contenido en vesículas, detectada tanto por espectrofotometría como por microscopía, se ha transferido a una cubeta para analizar en el espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Varian), a 45°C, la cinética de liberación de la CF retenida en el interior de vesículas (Ex. 450 nm/Em. 520 nm).

Para medir adecuadamente la liberación del soluto encapsulado y discernir entre la señal de fluorescencia debida al fluoróforo libre en el medio externo y la debida al fluoróforo encapsulado, se aprovecha la propiedad de la CF de autosilenciarse a altas concentraciones: Se procura una concentración de CF suficientemente alta en el medio interno vesicular, de modo que la liberación se mide directamente como el aumento de fluorescencia debido al aumento de concentración de CF no encapsulada. Una curva patrón realizada a partir de varias muestras de dilución de CF en tampón bicina permite traducir la señal de fluorescencia a unidades de concentración.

11.1.5 Cálculo de permeabilidad

De acuerdo con el desequilibrio osmótico, el flujo de salida de soluto desde el medio acuoso intravesicular al medio externo debe quedar descrito por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d[X]_{in}}{dt} = -q_x ([X]_{in} - [X]_{out}) = -\frac{P_x S_\mu}{V_{in}} ([X]_{in} - [X]_{out}) \quad \text{Ec. 11.1}$$

donde $[X]_{in}$ y $[X]_{out}$ representan respectivamente la concentración interna y externa del soluto X; y q_x es la constante cinética característica del proceso de flujo o de difusión pasiva, que puede a su vez expresarse como $P_x S_\mu / V_{in}$, donde P_x es el coeficiente de permeabilidad de X a través de la membrana vesicular, y S_μ y V_{in} son la superficie total de la membrana vesicular y el volumen total del interior acuoso, respectivamente. Esta ecuación previa puede ser integrada (ver Apéndice II), deduciéndose la siguiente regla, ya empleada en otros trabajos de permeabilidad (Chakrabarti y Deamer, 1992):

$$[X]_{out,t} - [X]_{out,0} = ([X]_{eq} - [X]_{out,0}) (1 - e^{-kt}) \quad \text{Ec. 11.2}$$

donde $[X]_{out,t}$ es la concentración externa del soluto a tiempo t , $[X]_{out,0}$ la concentración externa a tiempo inicial ($t=0$), y $[X]_{eq}$ la concentración de equilibrio, que puede comprobarse experimentalmente tras la adición de un detergente que solubilice la membrana (por ejemplo Triton-X100). De acuerdo con los cálculos y consideraciones del Apéndice II, la constante cinética de primer orden k toma un valor aproximadamente igual al cociente $P_x S_\mu / V_{in}$, de modo que en la práctica puede identificarse con la constante cinética de liberación, dada su similitud con el parámetro q_x . Puede obtenerse fácilmente calculando la pendiente en una representación semilogarítmica de $\ln([X]_{eq} - [X]_{out,t}) / ([X]_{eq} - [X]_{out,0})$ frente a t . En efecto, descomponiendo y reagrupando la Ecuación 11.2 se obtiene:

$$([X]_{eq} - [X]_{out,t}) - ([X]_{out,t} - [X]_{out,0}) = ([X]_{eq} - [X]_{out,0}) e^{-kt} \quad \text{Ec. 11.3}$$

que puede linealizarse tomando logaritmos:

$$\text{Ln}([X]_{eq} - [X]_{out,t}) = \text{Ln}([X]_{eq} - [X]_{out,0}) - kt \quad \text{Ec. 11.4}$$

El coeficiente de permeabilidad P_x puede estimarse a partir de la pendiente k suponiéndose una población de vesículas esféricas de radio r con una distribución de tamaños monodispersa, dada la siguiente aproximación:

$$P_x \approx \frac{k V_{in}}{S_\mu} \approx \frac{k r}{3} \quad \text{Ec. 11.5}$$

Adicionalmente, puede estimarse el coeficiente de difusión molecular D_x , que está relacionado con P_x a través de la expresión:

$$D_x = P_x \lambda N_A \quad \text{Ec. 11.6}$$

donde N_A es la constante de Avogadro y λ el grosor de la membrana, es decir de la bicapa.

11.2 Análisis estequiométrico de redes metabólicas

El análisis de estructura metabólica se ha realizado siguiendo la aproximación del análisis estequiométrico de las reacciones en el estado estacionario. Para ello se ha utilizado el programa METATOOL 4.2 (Pfeiffer et al., 1999), que ha sido diseñado para calcular los *modos elementales de flujo* y la *base convexa* de redes metabólicas. Esta información permite identificar las posibles rutas metabólicas y caracterizar la región admisible de distribuciones de flujos en el estado estacionario, respectivamente. Además, el programa incorpora un algoritmo para detectar *subconjuntos de reacciones* que operan estequiométricamente en dicho estado estacionario.

METATOOL recibe la información sobre la red metabólica a analizar a través de un fichero de entrada. En este fichero se debe indicar la lista del conjunto de transformaciones que suceden en el sistema e interesa analizar, acompañada de los nombres con que se identifican cada operación (reacción) y los distintos metabolitos. Debe especificarse cuáles de las operaciones (reacciones) se consideran reversibles y cuáles irreversibles, así como qué metabolitos se tratan como externos (entradas o salidas del sistema) y qué otros como internos (es decir, variables). El programa devuelve en un fichero de salida en formato texto, la matriz de coeficientes estequiométricos, la base convexa, los modos elementales de flujo, los subconjuntos de reacciones y otros aspectos complementarios.

La matriz de coeficientes estequiométricos o matriz estequiométrica N representa el conjunto de coeficientes estequiométricos con que interviene cada metabolito en cada reacción. Es de dimensión $m \times n$: tiene tantas filas como número de metabolitos internos (m) y tantas columnas como número de reacciones (n). Puede ser obtenida a partir de la siguiente ecuación, que representa la variación de las concentraciones de los metabolitos internos con el tiempo:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_m \end{pmatrix} = N r \quad , N \in R^{m \times n} \quad \text{Ec. 11.7}$$

donde r es un vector columna de dimensión $n \times 1$ correspondiente a los flujos de reacción. En cuanto a los modos elementales, base convexa y subconjuntos de reacciones, METATOOL utiliza la aproximación de cálculo en el estado estacionario. De esta manera, toda esta información se deriva por métodos algebraicos a partir de la ecuación anterior igualada a cero, es decir:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \dots \\ X_m \end{pmatrix} = N r = 0 \quad , N \in R^{m \times n} \quad \text{Ec. 11.8}$$

11.3 Estudio dinámico de sistemas compartimentados

Para realizar el estudio dinámico de los modelos protoceulares contemplando la naturaleza física del compartimento, se ha utilizado el programa ENVIRONMENT (Mavelli et al., 2008; Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010). ENVIRONMENT es una plataforma construida en C++ que permite realizar simulaciones estocásticas de la evolución temporal de sistemas de reacciones no homogéneos, formados por varios dominios acuosos y lipídicos.

El programa ha sido diseñado especialmente para poder estudiar *in silico* dinámicas de poblaciones protoceulares, ya que dispone del potencial para explorar la dinámica autoorganizativa de sistemas que integran reacciones químicas con el autoensamblaje de membrana y con procesos de transporte o difusión a través de ésta. Debe señalarse que ENVIRONMENT no sólo ofrece la posibilidad de analizar procesos químicos que ocurren dentro de distintos dominios físicos, considerando los fenómenos de transporte entre estos, sino también la propia evolución de los dominios como compartimentos dinámicos. Esta capacidad hace que esta plataforma sea una herramienta particularmente útil para estudiar de un modo realista la evolución de poblaciones de protocélulas que pueden crecer, desintegrarse o reproducirse (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2007a).

Para simplificar el funcionamiento, el programa considera los dominios internamente homogéneos, de manera que los gradientes de concentración y los fenómenos de difusión ocurren sólo en los límites entre dominios adyacentes.

11.3.1 Arquitectura del programa ENVIRONMENT

El programa se compone de varias clases de C++ orientadas a objetos, que permanecen coordinadas y ordenadas según una jerarquía, para poder simular del modo más sencillo posible la dinámica de sistemas reactivos no homogéneos (compartimentados).

Cada dominio reactivo homogéneo viene caracterizado en una clase denominada *Reactor* que contiene la información sobre el conjunto de especies y procesos que suceden en ese dominio. A su vez, cada reactor debe estar coordinado con las clases *Especies* y *Procesos* que guardan la información sobre la población de cada especie química y la probabilidad de transición por unidad de tiempo asociada a cada reacción, respectivamente. La clase denominada *Sistema* puede alojar o agrupar distintas clases, de modo que permite coordinar distintos reactores y a su vez sistemas subordinados a sus especificaciones. Normalmente está coordinada adicionalmente con la clase *Flujo*, donde se especifican los flujos de compuestos entre reactores, y la clase *Tarea*, donde se precisan algunas propiedades físicas especiales del sistema. Precisamente, es la clase *Sistema* la que ofrece la posibilidad de estudiar células (sistema) de un modo realista, como un conjunto de dominios reactivos (reactores) que intercambian compuestos a través de flujos, y capaces de generar propiedades físicas que dependen de sus interrelaciones (por ejemplo crecimiento mediado por diferencia de presión osmótica, ruptura o fisión). Ver (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010) para una explicación más detallada de la arquitectura de ENVIRONMENT.

Todas las instrucciones y especificaciones de los objetos se hacen a través de ficheros de entrada (un fichero para cada objeto). Habitualmente, para describir una vesícula, se definen tres dominios (reactores): uno para el interior acuoso, otro para la membrana y un tercero para el entorno. Los reactores *interior acuoso* y *membrana* están interrelacionados a través de una serie de flujos, por lo que se sitúan dentro de un sistema denominado *célula*, que permite alojar los flujos entre ambos reactores así como asignar unas propiedades geométricas a la célula o vesícula como conjunto. También define unas condiciones de estabilidad vesicular, basándose en la elasticidad y tolerancia osmótica de la membrana. A su vez, el sistema célula y el reactor *entorno* están comunicados y comparten compuestos químicos entre ellos, de modo que son alojados en un compartimento más general que es el sistema *principal*. En la Figura 11.1 se presenta un esquema que muestra los tipos de clases u objetos computacionales, sus jerarquías y sus relaciones entre ellos para el caso de la simulación de una vesícula en equilibrio con el entorno.

Como se observa en la figura, las clases *Flujo* y *Tarea* son coordinadas desde las clases *Sistema*. Permiten que los reactores no sean tanques aislados sino que sean abiertos (se establecen flujos), generando sistemas dinámicos que según sus propiedades físicas son capaces de responder a tensiones creciendo, rompiéndose o dividiéndose.

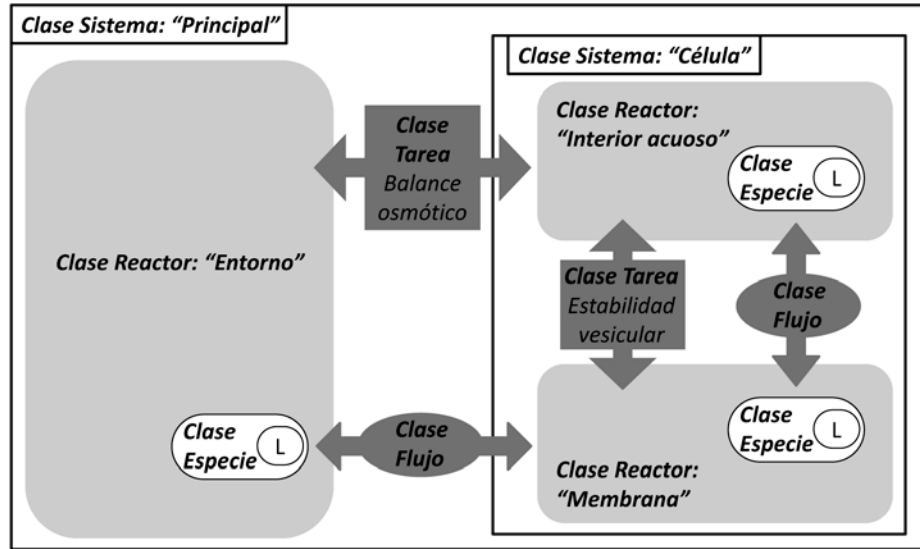


Figura 11.1 Esquema extraído y adaptado de (Mavelli et al., 2008) que muestra las clases u objetos computacionales utilizados por ENVIRONMENT para la simulación estocástica de una vesícula lipídica en equilibrio con el entorno. Se consideran tres dominios homogéneos (reactores). El interior acuoso y la membrana forman conjuntamente una unidad vesicular (sistema) dentro de la cual se define el intercambio de moléculas de lípido L entre ellos. En el sistema se especifica además la estabilidad vesicular. A su vez, la vesícula comunica con el entorno en un sistema principal, donde comparten lípido L y se establece un balance de presión osmótica entre el entorno y el interior acuoso de la vesícula.

11.3.2 Método de cálculo utilizado en la simulación estocástica

Para realizar la simulación estocástica, ENVIRONMENT implementa el método de Gillespie-Monte Carlo, ya descrito detalladamente en la Caja 4.1. Entonces el método se aplicaba a un sistema homogéneo de reacciones. Aquí el procedimiento es idéntico al de entonces, sólo que se amplía el espacio de posibles transiciones: Ahora el algoritmo considera como posibles eventos ya no sólo las transformaciones químicas de unas especies en otras (es decir las reacciones), sino también cada uno de los flujos entre dominios definidos en el modelo. A continuación se detalla la metodología de cálculo de probabilidades de evento con la plataforma ENVIRONMENT, que está ampliamente descrita en (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010).

El número de moléculas disponibles de cada especie química en cada dominio o reactor representa el estado del sistema a un determinado tiempo. Puede ser descrito por la siguiente matriz rectangular M :

$$M = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{1,2} & \dots & x_{1,D} \\ x_{2,1} & x_{2,2} & \dots & x_{2,D} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{N,1} & x_{N,2} & \dots & x_{N,D} \end{pmatrix} \quad \text{Ec. 11.9}$$

donde $x_{n,d}$ es la población molecular de cada especie n en cada dominio d , N el número total de especies moleculares y D el número total de dominios definidos. A partir de esta matriz M se calculan las probabilidades de transición por unidad de tiempo asociadas con los diferentes procesos, que son función de dicho estado del sistema; ya no sólo dependen de la abundancia de las especies químicas sino de su distribución en los distintos dominios. La probabilidad total por unidad de tiempo de abandonar el estado M se designa como $\Omega(M)$, y se obtiene como la suma de las probabilidades asociadas a cada proceso de reacción química en cada uno de los dominios y

a cada proceso de difusión (flujo). Distinguiendo entre la contribución debida a la suma de las probabilidades de los procesos de reacción química $\Omega^P(M)$, y la contribución debida a la suma de las probabilidades de flujo $\Omega^J(M)$:

$$\Omega(M) = \Omega^P(M) + \Omega^J(M) \quad \text{Ec. 11.10}$$

$$\Omega(M) = \sum_{d=1}^D \sum_{r=1}^R \omega_{r,d}^P(M) + \sum_{d=1}^D \sum_{\substack{d'=1 \\ d' \neq d}}^D \sum_{n=1}^N \omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'}) \quad \text{Ec. 11.11}$$

En esta última ecuación, $\omega_{r,d}^P(M)$ es la probabilidad de transición por unidad de tiempo de abandonar el estado M del sistema a través del proceso de reacción r sucediendo en el dominio d . En cambio, $\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'})$ es la probabilidad de transición por unidad de tiempo asociada al flujo de una molécula de la especie n entre dominios o reactores adyacentes d y d' .

Cada función $\omega_{r,d}^P(M)$ se calcula como se detalla en la Caja 4.1, como el producto de una constante cinética de dimensión tiempo⁻¹ y el tamaño poblacional de la especie o las especies involucradas como reactivos en la transformación (según se trate de una reacción monomolecular o bimolecular). En el caso de los flujos moleculares entre dominios adyacentes, la función $\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'})$ puede expresarse de distintas maneras según la naturaleza física de los dominios y su interrelación. Cuando se trata de dos dominios adyacentes equivalentes, de igual tamaño y naturaleza (bien acuosa, bien lipídica), la función $\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'})$ se obtiene de manera sencilla de la siguiente forma¹¹³:

$$\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'}) = D_n S_{d,d'} |\Delta[X_n]| \quad \text{Ec. 11.12}$$

El término D_n es el coeficiente de difusión molecular de la especie n en el medio considerado (expresado con dimensión longitud mol⁻¹ tiempo⁻¹), $S_{d,d'}$ es la superficie de contacto entre los dominios adyacentes d y d' , y $|\Delta[X_n]|$ es la diferencia de concentración de la especie n entre ambos dominios. Sin embargo, cuando se consideran los flujos de transporte a través de la membrana, es decir entre dos dominios acuosos separados por membrana (estrictamente, no adyacentes), la ecuación anterior se transforma en esta otra:

$$\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'}) = D_n^m S_\mu \frac{|\Delta[X_n]|}{\lambda} \quad \text{Ec. 11.13}$$

Ahora D_n^m es el coeficiente de difusión molecular de la especie n a través de la membrana m , y toma dimensión longitud² mol⁻¹ tiempo⁻¹, S_μ es la superficie de membrana, $|\Delta[X_n]|$ la diferencia entre la concentración de la especie n a ambos lados de la membrana y λ el grosor de ésta.

La expresión de la probabilidad de flujo molecular transmembrana por unidad de tiempo no es sino el equivalente microscópico de la ecuación diferencial de permeabilidad que ha sido empleada para el estudio determinista del flujo osmótico entre un medio intravesicular y otro extravesicular (Ecuación 11.1). Sí es cierto que tal como se ha planteado, $\omega_{d \rightarrow d'}^J(x_{n,d}, x_{n,d'})$

¹¹³ No es el caso de este trabajo, pero este sería por ejemplo el procedimiento habitual si interesara simular la difusión dentro de un mismo compartimento. En tal caso bastaría con fraccionar el volumen total del reactor en múltiples dominios de tamaño regular equivalente.

representa la probabilidad del flujo neto¹¹⁴, y se expresa tan sólo en función de la diferencia de concentraciones en valor absoluto, aunque el sentido del gradiente determine que corresponda con la probabilidad de un flujo neto en un sentido (por ejemplo de eflujo de un medio intravesicular a otro extravesicular), o de un flujo neto en el sentido contrario (de influjo al medio intravesicular). En cualquier caso, si se toma la ecuación macroscópica de permeabilidad, que describe la evolución temporal de la concentración del soluto (de dimensión mol volumen⁻¹ tiempo⁻¹), y se multiplica por el número de Avogadro N_A y por el volumen interno vesicular V_{in} , se obtiene una expresión particularizada de la probabilidad por unidad de tiempo (de dimensión tiempo⁻¹), que bien sea de un proceso de influjo o de eflujo, es semejante a la de la Ecuación 11.13:

$$\omega_{out \rightarrow in}^J(x_{n,out}, x_{n,in}) = \frac{d[X_n]_{in}}{dt} N_A V_{in} = -P_n^m S_\mu N_A ([X_n]_{in} - [X_n]_{out}) \quad \text{Ec. 11.14}$$

En efecto, recordando que $D_x = P_x \lambda N_A$, se deduce fácilmente que ambas expresiones de la probabilidad de flujo por unidad de tiempo a través de membrana (Ecuaciones 11.13 y 11.14) son equivalentes.

A lo largo de este trabajo de investigación, la permeabilidad de membrana se ha referido en numerosas ocasiones en términos de la constante cinética de flujo q_x o del coeficiente de permeabilidad P_x , pues son los parámetros que permiten describir los procesos de flujo de la forma más sencilla posible. Son cómodos de utilizar (por ejemplo en los estudios deterministas) y son además la forma habitual de expresión empleada en algunos trabajos experimentales relevantes en que se calcula la permeabilidad a varios compuestos (Mansy et al., 2008; Sacerdote y Szostak, 2005). Sin embargo, las simulaciones con ENVIRONMENT emplean para los cálculos los valores del coeficiente de difusión molecular D_x . Así, consideran la expresión de flujo de la Ecuación 11.13 (en lugar por ejemplo de la de la Ecuación 11.14). Esto significa que los valores de q_x o de P_x han de ser previamente convertidos a dimensiones y unidades del parámetro D_x . El motivo de este modo de proceder no es arbitrario: Por un lado, el valor de la constante q_x es menos “aséptico”, ya que es relativo a factores como el tamaño y la forma de la vesícula, que en otros casos se consideran constantes, pero que ahora, con los supuestos de simulación de la plataforma, pueden variar con el tiempo (ver próximo apartado). En lo que respecta a P_x , es independiente del tamaño y forma vesicular, pero depende del grosor de membrana λ , que también puede cambiar a lo largo de la simulación según la composición lipídica de membrana (aunque en este trabajo resulte invariante). D_x en cambio es indemne a cualquiera de estos factores anteriores.

A pesar de todo, es realista pensar que a su vez los distintos tipos de lípidos que componen una membrana puedan diferir en sus propiedades intrínsecas de permeabilidad (Mansy et al., 2008). Por este motivo, y para poder simular apropiadamente los flujos a través de vesículas de composición mixta, la plataforma ENVIRONMENT ha sido recientemente modificada para considerar la permeabilidad a un soluto como una función de la composición lipídica de membrana (Piedrafita et al., 2011; Ruiz-Mirazo et al., 2011). Más concretamente, como primera aproximación

¹¹⁴ Dado que el proceso de difusión pasiva es reversible, podrían haberse planteado alternativamente dos ecuaciones en lugar de una sola: una de ellas para la probabilidad de flujo por unidad de tiempo en un sentido (d a d’), y la otra para la probabilidad de flujo por unidad de tiempo en el sentido contrario (d’ a d). Cada cual dependería únicamente de la concentración de soluto en el dominio de origen. De alguna manera, la Ecuación 11.13 recapitula ambos fenómenos; representa el balance, y por eso considera la diferencia de concentraciones entre ambos dominios. En esencia, el comportamiento que se obtendría sería el mismo de un modo u otro, salvo porque en una situación de total equilibrio osmótico la Ecuación 11.13 se igualaría a cero y por tanto no admitiría fluctuaciones en las concentraciones de equilibrio debidas al flujo, mientras que definiendo las dos ecuaciones por separado esto sí sería posible, ya que se concebirían como dos probabilidades de transición independientes.

se ha supuesto que el coeficiente de difusión molecular de una membrana mixta (constituida por dos lípidos: l y L) a un soluto n, depende linealmente de su composición, es decir de la abundancia relativa de cada lípido en la membrana. De este modo, D_n^m se define como una función continua del siguiente tipo:

$$D_n^m = D_n^l + (D_n^L - D_n^l)\chi_S^L \quad \text{Ec. 11.15}$$

donde D_n^l es el coeficiente de difusión molecular de la especie n a través de una membrana únicamente constituida por lípido l, y D_n^L el correspondiente para una membrana pura de lípido L. χ_S^L es la contribución relativa del lípido L a la superficie de membrana; dicho de otro modo, el área relativa ocupada por lípido de tipo L, que se calcula como $\chi_S^L = \alpha_L x_{L,\mu} / (2S_\mu)$ (α_L es la superficie de la cabeza polar del lípido L y $x_{L,\mu}$ su población total en la membrana – ver apartado siguiente). En síntesis, D_n^m se actualiza en cada paso de simulación de acuerdo con la composición de la membrana, que puede ser cambiante con el tiempo.

De la ecuación anterior se desprende que si no existe lípido L en la membrana ($\chi_S^L = 0$), el coeficiente de difusión global de la membrana (D_n^m) coincide con D_n^l . Si ambos lípidos coexisten en la membrana, D_n^m adopta un valor intermedio entre D_n^l y D_n^L . Y finalmente, si la membrana está totalmente constituida por lípido L ($\chi_S^L = 1$), lógicamente $D_n^m = D_n^L$.

El supuesto de una dependencia lineal de la permeabilidad con la composición es claramente una aproximación muy simplificadora, quizá poco realista. En el estado actual de la plataforma, también es posible definir alternativamente D_n^m como una función no lineal (polinómica) de la composición (en tal caso D_n^m se expresa por sencillez en función de la fracción molar o concentración relativa del lípido L en la membrana χ_{molar}^L , considerada equivalente a su fracción molar en la mezcla):

$$D_n^m = a_1 + a_2(\chi_{molar}^L) + a_3(\chi_{molar}^L)^2 + \dots + a_z(\chi_{molar}^L)^{z-1} \quad , , D_n^l \equiv a_1 \quad , \quad D_n^L \equiv \sum_{i=1}^z a_i \quad \text{Ec. 11.16}$$

a_1, a_2, \dots, a_z son los coeficientes del polinomio de grado $z-1$. ENVIRONMENT permite asignar libremente tanto el grado del polinomio como el valor de estos parámetros, de modo que pueda personalizarse, según criterio, la función de dependencia y adecuarse por ejemplo a datos empíricos de permeabilidad en vesículas mixtas que se consideren de interés. Por todo ello, la plataforma cuenta con un gran potencial para estudiar los flujos moleculares a través de membrana de una forma realista.

11.3.3 Consideraciones generales en la modelización del compartimento

A continuación se describen las principales características del compartimento consideradas con ENVIRONMENT, referidas tanto a la estructura y morfología vesicular como a su dinamismo.

Propiedades geométricas

La membrana vesicular se trata como una estructura en bicapa cerrada sobre sí misma, formada por el autoensamblaje de moléculas de lípido. Las propiedades geométricas de la membrana dependen de su composición molecular. La superficie vesicular S_μ y el volumen de membrana V_μ se calculan del siguiente modo:

$$S_{\mu} = 0.5 \sum_{j=1}^J \alpha_j x_{j,\mu} \quad \text{Ec. 11.17}$$

$$V_{\mu} = \sum_{j=1}^J v_j x_{j,\mu} \quad \text{Ec. 11.18}$$

En las ecuaciones, $x_{j,\mu}$ corresponde con el número de moléculas de cada lípido j en la membrana. α_j y v_j representan respectivamente la superficie de la cabeza polar y el volumen de cada molécula de lípido j presente en la membrana. La fórmula para hallar S_{μ} está multiplicada por 0.5 para considerar únicamente la superficie de una de las caras de la bicapa lipídica.

En cada iteración, se supone un flujo instantáneo de agua que permite compensar las posibles diferencias de presión osmótica establecidas entre el interior y el exterior vesicular¹¹⁵. De esta manera, el volumen del interior acuoso V_{in} se reajusta en cada iteración de la siguiente forma:

$$V_{in} = \frac{V_{out} \sum_{n=1}^N x_{n,in}}{\sum_{n=1}^N x_{n,out}} \quad \text{Ec. 11.19}$$

El volumen del entorno V_{out} se considera constante, por ser mucho mayor que V_{in} . Los términos $x_{n,in}$ y $x_{n,out}$ representan el número de moléculas de cada especie n en el interior acuoso y en el medio externo a la vesícula, respectivamente.

Con estas propiedades geométricas, se observa que la superficie de membrana y el volumen del interior acuoso siguen dinámicas independientes (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010). Esto resulta ventajoso respecto a otros programas de simulación, ya que permite considerar (al menos implícitamente¹¹⁶) vesículas con formas no esféricas. Además, la relación superficie-volumen sirve como un criterio relativamente bueno para analizar la estabilidad vesicular de modo realista, es decir atendiendo a aspectos termodinámicos.

Estabilidad vesicular

Se define el parámetro *superficie reducida* o *factor de estabilidad* Φ como la relación entre la superficie real de la membrana (S_{μ}) y la superficie de una esfera ideal (S_{μ}^{\emptyset}) que contuviera el mismo volumen interno de la vesícula (V_{in}) (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010):

$$\Phi = \frac{S_{\mu}}{S_{\mu}^{\emptyset}} = \frac{S_{\mu}}{\sqrt[3]{36\pi V_{in}^2}} \quad \text{Ec. 11.20}$$

¹¹⁵ Tanto en membranas formadas por fosfolípidos diacílicos como en aquellas formadas por ácidos grasos (monoacílicos), la permeabilidad vesicular al agua es varios órdenes de magnitud mayor que la de cualquier soluto osmóticamente activo, bien se trate de un ion inorgánico (Na^+ , K^+ , Cl^- ...) o de un compuesto orgánico sencillo, como el glicerol o la urea (Paula et al., 1996; Mansy, 2010). En este sentido, el supuesto de un flujo instantáneo de agua resulta una aproximación razonable (por supuesto, con la conjetura de que los procesos reactivos que puedan provocar la producción o consumo neto de un cierto osmolito suceden también a su vez más lentamente que el flujo de agua).

¹¹⁶ No se simula la dinámica espacial del compartimento, como se podría hacer en estudios de dinámica molecular (Fellermann y Solé, 2007) o en otros modelos microscópicos de reacción-difusión (Macía y Solé, 2007). Sin embargo, manteniéndose en un nivel de descripción macroscópico, la morfología vesicular se deduce a partir de la relación superficie-volumen.

Lógicamente, si $\Phi = 1$, la vesícula es esférica. En cambio, cuando $\Phi < 1$, la vesícula está turgente (por ejemplo, debido a la presión osmótica interna). Y cuando $\Phi > 1$, la vesícula está relajada y puede adoptar una forma ovalada (por ejemplo, ante un medio externo hipertónico).

En las simulaciones de sistemas compartimentados con ENVIRONMENT, se considera que la forma esférica representa el estado de mínima energía de la membrana, y que conforme la vesícula adquiere formas distintas, se aleja de dicho estado y disminuye su estabilidad. Se supone razonablemente que la relación superficie-volumen sólo puede abarcar un rango restringido de valores. En primer término, éste se prefigura comprendido entre dos límites que resultan coherentes: (i.) La superficie real de la vesícula debe ser en cada iteración mayor que la superficie teórica de una esfera ideal que corresponda al volumen interno de la vesícula; de otro modo, la membrana se rompe por crisis osmótica, ya que la esfera es la forma volumétrica con menor relación superficie/volumen. (ii.) La superficie real de la vesícula debe ser en cada iteración menor que la superficie teórica que corresponda a dos vesículas esféricas de la mitad del volumen real del interior acuoso; de otro modo, la vesícula se divide dando lugar a dos células hijas idénticas, con la mitad de volumen que la progenitora. Es razonable que cuando la vesícula adopta formas muy relajadas (ovaladas), se divida para dar dos formas esféricas, minimizando la energía de curvatura (Baumgart et al., 2003; Hanczyc y Szostak, 2004). Estos dos límites determinan que el parámetro Φ sólo pueda estar comprendido entre los siguientes valores:

$$1 \leq \Phi \leq \sqrt[3]{2} \quad \text{Ec. 11.21}$$

Sin embargo, en las simulaciones con ENVIRONMENT se tiene en cuenta que las membranas reales son relativamente elásticas y flexibles, por lo que se consideran dos parámetros adicionales: tolerancia osmótica ε y tolerancia a la fisión η . Así, en verdad el margen de estabilidad vesicular resulta mayor; el valor que toma el parámetro Φ está acotado entre los siguientes límites:

$$(1 - \varepsilon) \leq \Phi \leq \sqrt[3]{2} (1 + \eta) \quad \text{Ec. 11.22}$$

De este modo, se contempla que las vesículas esféricas resisten en cierta medida soluciones hipotónicas, y responden a ellas hinchándose y por tanto aumentando la tensión elástica. Sólo cuando alcanzan un determinado tamaño por encima del cual la tensión es insostenible ($\Phi = 1 - \varepsilon$), se rompen. Por otra parte, cuando la vesícula tiene una superficie equivalente a la de dos vesículas esféricas con la mitad de volumen, la vesícula aún presenta cierta resistencia a la fisión, debido también a su flexibilidad. Si la tensión de curvatura sigue aumentando y supera un determinado umbral ($\Phi = \sqrt[3]{2} (1 + \eta)$), entonces sí que la vesícula se divide.

Tanto el valor de ε como el de η pueden variar en función de la composición de membrana (Ruiz-Mirazo y Mavelli, 2008). No obstante, en este trabajo para mayor simplicidad se ha preferido considerarlos como parámetros fijos, procurando, eso sí, que tomen en la medida de lo posible valores realistas. El parámetro ε puede ser determinado a partir de experimentos *in vitro* de resistencia de vesículas a soluciones hipotónicas (Chen et al., 2004; Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2007b). En el caso de vesículas de ácido oleico (C18:1), $\varepsilon \approx 0.21$. Éste es el valor que precisamente se ha escogido para las simulaciones de este trabajo. En cuanto al valor de tolerancia a la fisión, es mucho más difícil de determinar experimentalmente, dadas la diversidad de condiciones en las que en principio se puede producir la división (Hanczyc y Szostak, 2004). Como valor aproximativo, se ha escogido por defecto $\eta = 0.1$. Con estas premisas, el rango de estabilidad resulta: $0.79 \leq \Phi \leq 1.386$.

En definitiva, la plataforma permite estudiar de modo realista la estabilidad protoceular, y reproducir los fenómenos de choque osmótico y división de un modo que puede ajustarse razonablemente bien a datos proporcionados por experimentos *in vitro* con vesículas (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2007a).

Flujos de lípido entre dominios

La membrana de una vesícula está en constante equilibrio dinámico con el entorno acuoso. Se considera que la bicapa continuamente intercambia moléculas lipídicas tanto con el interior vesicular como con el medio externo¹¹⁷. Para simular estos flujos especiales, se definen en ENVIRONMENT dos procesos adicionales a las reacciones y flujos de transporte anteriormente mencionados, y que hacen referencia a la incorporación de lípidos a la membrana y a la liberación de lípidos desde la membrana (Mavelli y Ruiz-Mirazo, 2010).

La probabilidad de transición por unidad de tiempo asociada al proceso de incorporación de cada lípido j a la membrana, desde cada uno de los dominios acuosos d , se calcula así:

$$\omega_{d \rightarrow \mu}^j = k_{in}^j [X]_{j,d} S_{\mu} \quad \text{Ec. 11.23}$$

donde k_{in}^j es la constante cinética de incorporación del lípido j a la membrana, $[X]_{j,d}$ la concentración del lípido j en el dominio d (bien sea el interior acuoso o el medio externo) y S_{μ} es la superficie de membrana¹¹⁸.

En cuanto a la probabilidad de transición por unidad de tiempo asociada al proceso de liberación del lípido j de la membrana a cada uno de los dominios acuosos d , se calcula del siguiente modo:

$$\omega_{\mu \rightarrow d}^j = k_{out}^j x_{j,\mu} \quad \text{Ec. 11.24}$$

k_{out}^j es la constante cinética de liberación de lípido j desde la membrana, y $x_{j,\mu}$ es el número de moléculas de lípido j en la membrana.

En la situación de equilibrio de la vesícula con el entorno, ambos flujos (probabilidades de flujo) se igualan, de manera que se obtiene una expresión de la cual se puede despejar fácilmente la concentración de equilibrio del lípido j en la fase acuosa aq (tanto interior como exterior vesicular):

$$[X]_{j,aq}^{eq} = \frac{k_{out}^j x_{j,\mu}}{k_{in}^j S_{\mu}} \quad \text{Ec. 11.25}$$

¹¹⁷ Esto explica que siempre exista una concentración no nula del lípido como monómero disuelto en la solución acuosa (una concentración considerada equivalente al valor de la CVC). Las moléculas anfílicas de lípido “se debaten” entre su estado ensamblado (formando agregados) y su estado como monómero disuelto (Walde et al., 2006).

¹¹⁸ ENVIRONMENT ofrece la posibilidad de multiplicar la expresión anterior adicionalmente por un factor exponencial $f = \exp(1 - \Phi)/\Phi$. Éste ha sido ideado para considerar una incorporación de lípido más rápida en vesículas turgentes, un fenómeno que ha sido observado en algunos experimentos *in vitro* de competición (ver de nuevo (Chen et al., 2004)). Nótese que si $\Phi < 1$, $f > 1$ y por tanto la probabilidad del evento aumentaría. En cualquier caso, en este trabajo de investigación se ha prescindido de este término adicional, para evitar añadir mayor complejidad sobre los modelos que dificulte la interpretación de los resultados.

Teniendo en cuenta la expresión que relacionaba la superficie de membrana con su composición (Ecuación 11.17), la concentración de equilibrio en fase acuosa del lípido j considerado también puede calcularse así:

$$[X]_{j,aq}^{eq} = 2 \frac{k_{out}^j}{k_{in}^j} \frac{x_{j,\mu}}{\sum_{j=1}^J \alpha_j x_{j,\mu}} \quad \text{Ec. 11.26}$$

donde α_j y $x_{j,\mu}$ representa nuevamente la superficie de la cabeza polar y el tamaño poblacional de cada tipo molecular de lípido presente en la membrana, respectivamente.

11.4 Otros métodos numéricos de análisis computacional

11.4.1 Cálculo numérico de soluciones estacionarias

Se ha implementado en MATLAB 7.10 el método numérico de Newton-Raphson de cálculo de raíces (ceros) de funciones, que permite resolver, a través de un proceso iterativo, soluciones de ecuaciones o sistemas de ecuaciones no lineales. Con cada valor de los parámetros se han ensayado diversos valores de cebamiento de las variables para garantizar la convergencia a todos y cada uno de los estados estacionarios posibles.

11.4.2 Análisis de estabilidad de estados estacionarios

A partir de las ecuaciones diferenciales que describen la evolución temporal de las concentraciones de los metabolitos, se ha calculado el sistema variacional linealizado respecto al estado estacionario que corresponda. Se trata de un sistema de ecuaciones diferenciales particularizado para los valores de concentración estacionaria que describe cómo evolucionan con el tiempo mínimas perturbaciones realizadas en cada concentración de metabolito, δX_i , cerca de dicho estado estacionario. Las soluciones de este sistema son del siguiente tipo (para un hipotético caso con m metabolitos):

$$\begin{aligned} \delta X_1 &= c_1 a_{11} e^{\lambda_1 t} + c_2 a_{12} e^{\lambda_2 t} + \dots + c_m a_{1m} e^{\lambda_m t} \\ \delta X_2 &= c_1 a_{21} e^{\lambda_1 t} + c_2 a_{22} e^{\lambda_2 t} + \dots + c_m a_{2m} e^{\lambda_m t} \\ &\dots \\ \delta X_m &= c_1 a_{m1} e^{\lambda_1 t} + c_2 a_{m2} e^{\lambda_2 t} + \dots + c_m a_{mm} e^{\lambda_m t} \end{aligned} \quad \text{Ec. 11.27}$$

donde c_k son parámetros relativos a las condiciones iniciales de la perturbación en cada metabolito, y a_{jk} y λ_k se identifican, respectivamente, como los autovectores y autovalores del determinante jacobiano. Así pues, la estabilidad se ha evaluado a través del cálculo de los autovalores y autovectores (hallados con la rutina *eig* de MATLAB).

Siempre que todos los autovalores obtenidos tengan parte real negativa, la solución de estado estacionario es asintóticamente estable, puesto que ello supone que independientemente del valor de c_k y a_{jk} , cualquier término $e^{\lambda_k t}$ de la expresión 11.27 es menor que 1, y por tanto cualquier perturbación disminuye con el tiempo. De otra forma, si alguno de los autovalores presenta parte real positiva, el estado estacionario es inestable.

11.4.3 Análisis dinámico determinista

En el caso de los modelos de sistemas homogéneos de reacciones, las ecuaciones diferenciales que describen la evolución de las concentraciones con el tiempo han sido integradas con MATLAB 7.10 siguiendo un método de integración numérica de Runge-Kutta (rutina *ode45*). En ocasiones también se ha empleado la rutina *ode15s*. Los resultados han sido comprobados paralelamente por integración numérica con COPASI.

El análisis determinista en los modelos de sistemas compartimentados que consideran la dinámica física del compartimento ha requerido el diseño de un algoritmo específico apropiado. Éste implementa el método de Euler de integración numérica de las ecuaciones diferenciales cinéticas, al tiempo que en cada paso de integración, actualiza las propiedades geométricas del compartimento y los distintos atributos de la membrana, y verifica que se cumplen las condiciones de estabilidad. En esencia, traslada las consideraciones generales de la simulación estocástica con ENVIRONMENT (Apartado 11.3.3) a un tratamiento determinista (ver ejemplo en Apéndice III).

Apéndice I

Cálculo simbólico de soluciones de estado estacionario

A continuación se describe el procedimiento seguido para hallar las posibles soluciones explícitas de estados estacionarios no nulos del modelo metabólico de la Figura 3.1. Con objeto de facilitar el manejo de las expresiones contenidas en la Ecuación 3.6, se ha utilizado una notación más sencilla para describir las variables de concentración de los intermediarios metabólicos. Así, los términos $[M_i]$ han sido sustituidos por términos x_i , según las siguientes equivalencias:

$$\begin{aligned} [\text{STU}] &\equiv x_1 \\ [\text{STUS}] &\equiv x_2 \\ [\text{STUST}] &\equiv x_3 \\ [\text{ST}] &\equiv x_4 \\ [\text{SU}] &\equiv x_5 \\ [\text{SUST}] &\equiv x_6 \\ [\text{SUSTU}] &\equiv x_7 \\ [\text{STUSU}] &\equiv x_8 \end{aligned} \quad \text{Ec. AI. 1}$$

Tras igualar las ecuaciones diferenciales a cero (Ecuación 3.6), se han realizado sucesivos pasos de simplificación haciendo combinaciones lineales de las ecuaciones, lo que permite realizar fácilmente sustituciones de ciertas variables por otras. Así:

$$\begin{aligned} k_6 U x_6 &= k_4 x_1 + k_{-6} x_7 \\ k_{-2} x_3 &= -k_4 x_1 + k_2 T x_2 - k_{11} x_4 \\ k_{-9} x_8 &= (k_4 - k_1 S) x_1 + (k_{-1} + k_9 U) x_2 + k_{11} x_4 \\ k_{-1} x_2 &= (k_1 S - k_4) x_1 - k_{11} x_4 - k_8 x_5 \\ k_{-10} k_7 k_{-9} k_{-1} x_7 &= (k_{-10} k_4 k_{-9} k_{-1} + k_9 U k_{10} k_{-7} (k_1 S - k_4)) x_1 - k_9 U k_{10} k_{-7} k_{11} x_4 \\ &\quad - (k_{-1} k_{-9} + k_{-1} k_{10} + k_9 U k_{10}) k_{-7} k_8 x_5 \end{aligned} \quad \text{Ec. AI. 2}$$

De este modo, finalmente resulta un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas del siguiente tipo:

$$\begin{aligned} Ax_1 + Bx_4 + Cx_5 + Dx_1x_4 &= 0 \\ Ex_1 + Fx_4 + Gx_5 + Hx_4x_5 &= 0 \\ Ix_1 + Jx_4 + Kx_5 + Lx_1x_5 &= 0 \end{aligned} \quad \text{Ec. AI. 3}$$

donde:

$$\begin{aligned} A &= k_{-1}k_4(k_{-2} + k_3) + k_3k_2T(k_4 - k_1S) \\ B &= (k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_3k_2T)k_{11} \\ C &= k_3k_2Tk_8 \\ D &= k_{-2}k_{-3}k_{-1} \\ E &= -(k_4k_{-10}k_7k_{-9}k_{-1}(k_{-5} + k_6U) + k_{-10}k_4k_{-9}k_{-1}k_{-5}k_{-6} + k_9Uk_{10}k_{-7}(k_1S - k_4)k_{-5}k_{-6}) \\ F &= k_{-5}k_{-6}k_9Uk_{10}k_{-7}k_{11} \\ G &= (k_{-1}k_{-9} + k_{-1}k_{10} + k_9Uk_{10})k_{-5}k_{-6}k_{-7}k_8 \\ H &= k_6Uk_5k_{-10}k_7k_{-9}k_{-1} \\ I &= k_9Uk_{10}k_{-7}(k_4 - k_1S) \\ J &= k_9Uk_{10}k_{-7}k_{11} \\ K &= (k_{-1}k_{-9} + k_{-1}k_{10} + k_9Uk_{10})k_{-7}k_8 \\ L &= k_{-7}k_{-10}k_{-9}k_{-1} \end{aligned} \quad \text{Ec. AI. 4}$$

Como las constantes cinéticas sólo pueden tomar valores positivos, se deduce que los parámetros B , C , D , F , G , H , J , K y L siempre han de ser positivos. En cambio, A , E , e I pueden tomar valores positivos o negativos según el valor numérico de las constantes.

De la tercera de las ecuaciones de Ec. AI.3 se puede despejar x_5 en función de x_1 y x_4 :

$$x_5^{ss} = \frac{-Ix_1^{ss} - Jx_4^{ss}}{K + Lx_1^{ss}} \quad \text{Ec. AI. 5}$$

Sustituyendo este valor de x_5^{ss} en la primera de las ecuaciones de Ec. AI.3, se puede despejar x_4 como:

$$x_4^{ss} = \frac{-AL(x_1^{ss})^2 + (CI - AK)x_1^{ss}}{BK - CJ + (BL + DK)x_1^{ss} + DL(x_1^{ss})^2} \quad \text{Ec. AI. 6}$$

Finalmente, se puede obtener una expresión con una sola variable al sustituir estos valores de x_5 y x_4 en la segunda de las ecuaciones de Ec. AI.3. Resulta una ecuación complicada, de la forma:

$$a(x_1^{ss})^5 + b(x_1^{ss})^4 + c(x_1^{ss})^3 + d(x_1^{ss})^2 + ex_1^{ss} + f = 0 \quad \text{Ec. AI. 7}$$

Para mayor simplicidad, no se detalla el valor de los coeficientes a , b , c , d , e y f , que resultan ser largas combinaciones de los parámetros previos $\{A - L\}$. En cualquier caso, al tratarse de una ecuación de quinto grado, no resoluble de forma analítica, no es posible hallar de forma explícita el valor de la variable x_1 . Es necesario por tanto recurrir a métodos numéricos para resolver esta ecuación.

Apéndice II

Integración de la ecuación de flujo osmótico a través de membrana y consideraciones para el cálculo de la permeabilidad

Se considera una situación en la cual existe un desequilibrio osmótico del soluto X a ambos lados de la membrana permeable, entre el medio acuoso intravesicular y el medio acuoso externo. De acuerdo con la ley de Fick, en respuesta al desequilibrio osmótico se producirá un flujo proporcional al gradiente de concentración en el sentido opuesto a éste. Así, la variación del número de moles de la especie X en el medio interno vesicular como consecuencia de su difusión o transporte pasivo a través de membrana y liberación al medio externo, puede describirse mediante la siguiente ecuación (se conserva la notación usada en Material y Métodos):

$$\frac{dN_x^{\text{in}}}{dt} = -P_x S_\mu ([X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}}) \quad \text{Ec. AII. 1}$$

También puede expresarse en términos de concentración¹¹⁹:

$$\frac{d[X]_{\text{in}}}{dt} = -\frac{P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} ([X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}}) \quad \text{Ec. AII. 2}$$

La ecuación anterior contiene dos variables temporales: $[X]_{\text{out}}$ y $[X]_{\text{in}}$. Interesa obtener una expresión con una sola variable. Para ello expresaremos $[X]_{\text{out}}$ en función de $[X]_{\text{in}}$. Se puede deducir que:

$$[X]_{\text{out}} = \frac{N_x^{\text{out}}}{V_{\text{out}}} = \frac{N_x^{\text{total}} - N_x^{\text{in}}}{V_{\text{out}}} = \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} - \frac{[X]_{\text{in}} V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \quad \text{Ec. AII. 3}$$

Sustituyendo el valor de $[X]_{\text{out}}$ en la ecuación Ec. AII.2 queda:

¹¹⁹ El término $P_x S_\mu / V_{\text{in}}$ puede ser resumido como una única constante cinética fenomenológica, que puede denominarse q_x . Aunque seguiremos trabajando con los parámetros originales a lo largo del desarrollo, mencionaremos de nuevo el parámetro q_x al final del mismo.

$$\frac{d[X]_{\text{in}}}{dt} = -\frac{P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} \left([X]_{\text{in}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} + \frac{[X]_{\text{in}} V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) \quad \text{Ec. AII. 4}$$

Ahora ya sí se puede proceder a integrar la ecuación para estudiar cómo es el comportamiento dinámico de este proceso. Se agrupan las variables, quedando la siguiente expresión:

$$\int \frac{d[X]_{\text{in}}}{[X]_{\text{in}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} + \frac{[X]_{\text{in}} V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}}} = \frac{-P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} \int dt \quad \text{Ec. AII. 5}$$

O lo que es lo mismo:

$$\int \frac{d[X]_{\text{in}}}{[X]_{\text{in}} \left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}}} = \frac{-P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} \int dt \quad \text{Ec. AII. 6}$$

La integral del primer miembro resulta ser del tipo $\int \frac{dx}{ax-b}$, cuya función primitiva es del tipo $\frac{\text{Ln}(ax-b)}{a}$. Por tanto el resultado de integración es:

$$\frac{\text{Ln} \left[\left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) [X]_{\text{in}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} \right]}{\left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right)} = \frac{-P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} t + c_1 \quad \text{Ec. AII. 7}$$

donde el término c_1 es la constante de integración. Reorganizando, queda:

$$\text{Ln} \left[\left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) [X]_{\text{in}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} \right] = \frac{-P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} \left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) t + c_2 \quad \text{Ec. AII. 8}$$

Y si a continuación realizamos el exponencial de ambos miembros de la ecuación, se obtiene:

$$\left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) [X]_{\text{in}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} = c_3 \exp \left[\frac{-P_x S_\mu}{V_{\text{in}}} \left(1 + \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 9}$$

donde c_3 representa una nueva constante. Desarrollando la expresión queda:

$$[X]_{\text{in}} + [X]_{\text{in}} \frac{V_{\text{in}}}{V_{\text{out}}} - \frac{N_x^{\text{total}}}{V_{\text{out}}} = c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 10}$$

Podemos identificar el segundo y tercer términos del primer miembro como $-[X]_{\text{out}}$ (recordando la expresión que relacionaba $[X]_{\text{out}}$ con $[X]_{\text{in}}$). Así, la ecuación se puede expresar por fin como:

$$[X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}} = c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 11}$$

Si bien la expresión previa es satisfactoria para describir el comportamiento dinámico, debemos encontrar otra expresión que resulte más útil para el caso práctico que nos ocupa, en el cual sólo se tiene un registro de la evolución temporal de $[X]_{\text{out}}$ pero no de la de $[X]_{\text{in}}$. Podemos expresar $[X]_{\text{in}}$ en función de $[X]_{\text{out}}$, considerando el parámetro de concentración de equilibrio $[X]_{\text{eq}}$:

$$[X]_{eq} = [X]_{in} \frac{V_{in}}{V_{total}} + [X]_{out} \frac{V_{out}}{V_{total}} \quad \text{Ec. AII. 12}$$

Así,

$$[X]_{eq} V_{total} = [X]_{in} V_{in} + [X]_{out} V_{out} \quad \text{Ec. AII. 13}$$

Luego

$$[X]_{in} = \frac{[X]_{eq} V_{total} - [X]_{out} V_{out}}{V_{in}} \quad \text{Ec. AII. 14}$$

Sustituyendo este valor en la ecuación general (Ec. AII.11), obtenemos:

$$\frac{[X]_{eq} V_{total} - [X]_{out} V_{out}}{V_{in}} - [X]_{out} = c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 15}$$

Es decir:

$$[X]_{out} \left(1 + \frac{V_{out}}{V_{in}} \right) = [X]_{eq} \frac{V_{total}}{V_{in}} - c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 16}$$

Y puesto que $V_{in} + V_{out} = V_{total}$, esto es lo mismo que:

$$[X]_{out} \left(\frac{V_{total}}{V_{in}} \right) = [X]_{eq} \frac{V_{total}}{V_{in}} - c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 17}$$

Despejando $[X]_{out}$ queda:

$$[X]_{out} = \frac{[X]_{eq} \frac{V_{total}}{V_{in}} - c_3 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right]}{\left(\frac{V_{total}}{V_{in}} \right)} \quad \text{Ec. AII. 18}$$

Y simplificando:

$$[X]_{out} = [X]_{eq} - c_4 \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 19}$$

donde ahora c_4 es una nueva constante cuyo valor se puede deducir fácilmente. Supongamos el caso en que $t=0$. Entonces $[X]_{out}$ toma el valor $[X]_0$, y se cumple la siguiente igualdad:

$$[X]_0 = [X]_{eq} - c_4 \quad \text{Ec. AII. 20}$$

Por tanto:

$$c_4 = [X]_{eq} - [X]_0 \quad \text{Ec. AII. 21}$$

Si sustituimos este valor en la ecuación general, se obtiene:

$$[X]_{out} = [X]_{eq} - ([X]_{eq} - [X]_0) \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{in}} + \frac{1}{V_{out}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 22}$$

Restando $[X]_0$ en los dos miembros resulta:

$$[X]_{\text{out}} - [X]_0 = ([X]_{\text{eq}} - [X]_0) - ([X]_{\text{eq}} - [X]_0) \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \right) t \right] \quad \text{Ec. AII. 23}$$

Y finalmente, simplificando se obtiene:

$$[X]_{\text{out}} - [X]_0 = ([X]_{\text{eq}} - [X]_0) \left[1 - \exp \left[-P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \right) t \right] \right] \quad \text{Ec. AII. 24}$$

Que de forma genérica se puede expresar como:

$$[X]_{\text{out}} - [X]_0 = ([X]_{\text{eq}} - [X]_0) (1 - e^{-kt}) \quad \text{Ec. AII. 25}$$

La ecuación Ec. AII.25 ya sí permite calcular el coeficiente de permeabilidad P_x a partir de las medidas experimentales de evolución temporal de la concentración de soluto en el medio externo. En efecto, una vez obtenida la constante fenomenológica del proceso exponencial, k , se puede calcular P_x , ya que:

$$k \equiv P_x S_\mu \left(\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \right) \quad \text{Ec. AII. 26}$$

No obstante, en la práctica este cálculo resulta difícil ya que V_{in} y V_{out} son difíciles de precisar. En realidad, puesto que es razonable que $V_{\text{out}} \gg V_{\text{in}}$, se considera:

$$\frac{1}{V_{\text{in}}} + \frac{1}{V_{\text{out}}} \approx \frac{1}{V_{\text{in}}} \quad \text{Ec. AII. 27}$$

y así:

$$k \approx P_x \frac{S_\mu}{V_{\text{in}}} \quad \text{Ec. AII. 28}$$

Esto, bajo el supuesto de una mezcla homogénea de vesículas extruídas esféricas del mismo tamaño, es equivalente a:

$$k \approx 3P_x / r \quad \text{Ec. AII. 29}$$

donde r es el radio vesicular. Por tanto, para el cálculo de P_x se suele considerar esta aproximación anterior: $P_x \approx (k r) / 3$

Por otra parte, bajo los supuestos anteriores se demuestra que el parámetro k nos da precisamente el valor del parámetro cinético q_x (mencionado en la nota al pie de la primera página de este apéndice). En efecto, recordamos que definimos $q_x = P_x S_\mu / V_{\text{in}}$. Así, podremos concluir que la descripción general del proceso difusivo en realidad se puede aproximar como:

$$\frac{d[X]_{\text{in}}}{dt} \approx -k([X]_{\text{in}} - [X]_{\text{out}}) \quad \text{Ec. AII. 30}$$

Apéndice III

Código de MATLAB desarrollado para el análisis determinista de un compartimento lipídico modelo permeable a nutrientes

A continuación se detalla el código de MATLAB desarrollado para analizar de forma determinista la dinámica de un sistema consistente en una vesícula lipídica de composición pura que incorpora por difusión pasiva a través de membrana un cierto nutriente X disponible en el medio externo. Esta situación corresponde con el modelo cinético de la Figura 8.6 y los resultados deterministas del Apartado 8.2.2. Al igual que sucede con las simulaciones estocásticas con ENVIRONMENT, tanto la cinética de influjo del nutriente como la estructura y dinámica del compartimento y su membrana han sido consideradas en el algoritmo de cálculo.

```
%-----  
% Euler integration of empty lipid compartment, which fills up with X  
%-----  
  
%Iterations:  
h = 0.01; %step size  
tend = 50000; %end time  
nsamples = 400;  
  
%Geometrical properties of Vesicle:  
Na = 6.0221415e23;  
Venv = 5.23333e-16; %L  
NaVenv = Na*Venv;  
r = 50; %vesicular radius (nm)  
Vcore = (4/3)*pi*(r^3); %nm^3  
Vcore = Vcore*1E-24; %L  
NaVcore = Na*Vcore;  
Sm = 4*pi*(r^2); %nm^2  
Sm = Sm*1E-16; %dm^2  
alpha = 0.2; %lipid head area (nm^2)  
alpha = alpha*1E-16; %dm^2  
  
%Concentrations:
```

```

lm = (Sm*2)/alpha;
Lenv = 0.00795; %M
Xenv = 0.01; %M %constant
Benv = 0.1; %M %constant
Lcore = 0.00795; %M
Xcore = 0; %M
Bcore = 0.11; %M

%Kinetic constants:
kl = 6.042E-3; %s-1
klm = 7.6E16; %s-1 M-1 dm-2
Dx = 3.78E5; %dm2 s-1 mol-1
thick = 3; %membrane thickness (nm)
thick = thick*1E-8; %dm

%Additional parameters:
bcore = Bcore*NaVcore; %constant
lt = lm + Lenv*NaVenv + Lcore*NaVcore; %(total lipid) % constant

%-----

%NUMERICAL INTEGRATION: Euler
var_euler = zeros((nsamples+1), 9);
i=1;
for t=0:h:tend

    %populations:
    lcore = Lcore*NaVcore;
    xcore = Xcore*NaVcore;

    %conditions to be accomplished:
    Vcore = Vcore * ((Xcore+Bcore+Lcore) / (Xenv+Benv+Lenv)); %L
    NaVcore = Na*Vcore;
    Sm = (lm*alpha)/2;
    phi = Sm/((36*pi*(Vcore^2))^(1/3));

    Vm = alpha*(thick/2)*lm; %L
    NaVm = Na*Vm;
    Lm = lm/(NaVm); %M

    %new conc (rescaled according to new Vcore):
    Lcore = lcore/(NaVcore);
    Xcore = xcore/(NaVcore);
    Bcore = bcore/(NaVcore);

    %save new conc:
    if (t >= (i-1)*(tend/nsamples)) %recogemos sólo 400 puntos...
    var_euler(i,:)=[t Xcore Lcore lm Lenv Vcore Sm phi
    Xcore*NaVcore];
    i=i+1;
    end

    %ODEs
    dLenv_dt = (kl/(NaVenv))*Lm*(NaVm)-(klm/(NaVenv))*Sm*Lenv;
    dLcore_dt = (kl/(NaVcore))*Lm*(NaVm)-(klm/(NaVcore))*Sm*Lcore;
    dXcore_dt = (Dx*Sm/thick)*(1/(NaVcore))*(Xenv-Xcore);

    %New step values:
    Lenv = Lenv + h*dLenv_dt;
    Lcore = Lcore + h*dLcore_dt;
    Xcore = Xcore + h*dXcore_dt;

```

```
    lm = lt - Lenv*NaVenv - Lcore*NaVcore;  
end  
  
fichero=['vesicle_permeability_euler_conc_aprox.mat'];  
save(fichero);
```


Relación de siglas

CF	Carboxifluoresceína
<i>CVC</i>	Concentración crítica de surfactante necesaria para la formación de vesículas
DLPC	Dilauroil-glicerol-fosfocolina
GML	Lauroilglicerol
GMO	Oleilglicerol
LA	Ácido láurico
OA	Ácido oleico
POPC	Palmitoil-oleil-glicerol-fosfocolina

Bibliografía

Abraham RH, y Shaw CD (2005) *Dynamics: The geometry of behavior* (4th ed.). Aerial Press, Santa Cruz, CA.

Adamala K, y Szostak JW (2013) Competition between model protocells driven by an encapsulated catalyst. *Nature Chemistry*, 5(6):495–501.

Apel CL, Deamer DW, y Mautner MN (2002) Self-assembled vesicles of monocarboxylic acids and alcohols: conditions for stability and for encapsulation of biopolymers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1559:1–9.

Ashkenasy G, Jegasia R, Yadav M, y Ghadiri MR (2004) Design of a directed molecular network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:10872–10877.

Bachmann PA, Luisi PL, y Lang J (1992) Autocatalytic self-replicating micelles as models for prebiotic structures. *Nature*, 357:57–59.

Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, y Patel NH (2007) *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Baumgart T, Hess ST, y Webb WW (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425(6960):821–4.

Berclaz N, Muller M, Walde P, y Luisi PL (2001) Growth and transformation of vesicles studied by ferritin labeling and cryotransmission electron microscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:1056–1064.

Blöchliger E, Blocher M, Walde P, y Luisi PL (1998) Matrix Effect in the Size Distribution of Fatty Acid Vesicles. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:10383–10390.

Briones C, Stich M, y Manrubia SC (2009) The dawn of the RNA World: toward functional complexity through ligation of random RNA oligomers. *RNA*, 15(5):743–749.

Budin I, y Szostak JW (2011) Physical effects underlying the transition from primitive to modern cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(13):5249–54.

Butlerow A (1861) Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 120:295–298.

- Cape J, Monnard PA, y Boncella JM (2011) Prebiotically relevant mixed fatty acid vesicles support anionic solute encapsulation and photochemically catalyzed trans-membrane charge transport. *Chemical Science*, 2(4):661–667.
- Casti JL (1988) The theory of metabolism–repair systems. *Applied Mathematics and Computation*, 28:113–154.
- Cech TR, Zaug AJ, y Grabowski PJ (1981) In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, 27:487–496.
- Chakrabarti AC, y Deamer DW (1992) Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1111(2):171–7.
- Chen IA, y Szostak JW (2004a) A kinetic study of the growth of fatty acid vesicles. *Biophysical Journal*, 87:988–998.
- Chen IA, y Szostak JW (2004b) Membrane growth can generate a transmembrane pH gradient in fatty acid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:7965–7970.
- Chen IA, y Walde P (2010) From self-assembled vesicles to protocells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7):a002170.
- Chen IA, Roberts RW, y Szostak JW (2004) The emergence of competition between model protocells. *Science*, 305:1474–1476.
- Cheng Z. y Luisi PL (2003) Coexistence and mutual competition of vesicles with different size distributions. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:10940–10945.
- Cornish-Bowden A, y Cárdenas ML (2007) Organizational invariance in (M,R) -systems. *Chemistry and Biodiversity*, 4:2396–2406.
- Cornish-Bowden A, y Cárdenas ML (2008) Self-organization at the origin of life. *Journal of Theoretical Biology*, 252:411–418.
- Cornish-Bowden A, Cárdenas ML, Letelier JC, y Soto-Andrade J (2007) Beyond reductionism: Metabolic circularity as a guiding vision for a real biology of systems. *Proteomics*, 7:839–845.
- Deamer DW (1985) Boundary structures are formed by organic components of the Murchison carbonaceous chondrite. *Nature*, 317:792–794.
- Deamer DW (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbons: primitive pigment systems in the prebiotic environment. *Advances in Space Research*, 12(4):183–189.
- Deamer DW (1997) The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61:239–61.
- Deamer DW (2008) Origins of life: how leaky were primitive cells? *Nature*, 454:37–38.
- Deamer DW (Ed.) (2010) *Special Collection of Essays: What is Life?* Astrobiology, 10(10):1001–1042.
- de Duve C (1991) *Blueprint for a cell: The nature and origin of life*. Portland Press.

- Dyson FJ (1982) A model for the origin of life. *Journal of Molecular Evolution*, 18:344–50.
- Eigen M, y Schuster P (1977) The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften*, 64(11):541–565.
- Eigen M, y Schuster P (1979) *The hypercycle: a principle of natural self-organization*. Springer, New York.
- Epstein IR, y Vanag VK (2005) Complex patterns in reactive microemulsions: self-organized nanostructures? *Chaos*, 15:047510-1-7.
- Farmer J, Kauffman S, y Packard N (1986) Autocatalytic replication of polymers. *Physica D*, 22:50–67.
- Fellermann H, y Solé RV (2007) Minimal model of self-replicating nanocells: a physically embodied information-free scenario. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1486):1803–11.
- Ferris JP, y Ertem G (1992) Oligomerization of ribonucleotides on montmorillonite: reaction of the 5'-phosphorimidazolid of adenosine. *Science*, 257:1387–1389.
- Fleischaker GR (1988) Autopoiesis: the status of its system logic. *Biosystems*, 22(1):37–49.
- Fleischaker GR (1990) Origins of life: An operational definition. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 20:127–137.
- Gánti T (1975) Organization of chemical reactions into dividing and metabolizing units: the chemotons. *Biosystems*, 7(1):15–21.
- Gánti T (2002) On the early evolutionary origin of biological periodicity. *Cell Biology International*, 26(8):729–35.
- Gánti T, Griesemer J, y Szathmáry E (2003) *The principles of life*. Oxford University Press, Oxford.
- Gayon J, Malaterre C, Morange M, Raulin-Cerceau M, y Tirard S (Eds.) (2010) *Special issue: defining life*. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 40:119–244.
- Gebicki JM, y Hicks M (1973) Ufasomes are stable particles surrounded by unsaturated fatty acid membranes. *Nature*, 243:232–234.
- Gilbert W (1986) The RNA world. *Nature*, 319:618.
- Gillespie DT (1976) A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics*, 22:403.
- Gillespie DT (1977) Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *Journal of Physical Chemistry*, 81:2340.
- Goldbeter A (2010) *La Vie oscillatoire. Au coeur des rythmes du vivant*. Odile Jacob, Paris.
- Gorlero M, Wieczorek R, Adamala K, Giorgi A, Schininà ME, Stano P, y Luisi PL (2009) Ser-His catalyses the formation of peptides and PNAs. *FEBS Letters*, 583(1):153–6.

- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, y Altman S (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35:849–857.
- Hanczyc MM, y Szostak JW (2004) Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(6):660–4.
- Hanczyc MM, Fujikawa SM, y Szostak JW (2003) Experimental models of primitive cellular compartments: Encapsulation, growth, and division. *Science*, 302:618–622.
- Hanczyc MM, Toyota T, Ikegami T, Packard N, y Sugawara T (2007) Fatty acid chemistry at the oil-water interface: self-propelled oil droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129:9386–9391.
- Handorf T, Ebenhöf O, y Heinrich R (2005) Expanding metabolic networks: scopes of compounds robustness evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 61:498–512.
- Hargreaves WR, y Deamer DW (1978) Liposomes from ionic, singlechain amphiphiles. *Biochemistry*, 17:3759–3768.
- Harold FM (1991) Biochemical topology – from vectorial metabolism to morphogenesis. *Bioscience Reports*, 11:347–385.
- Hitz T, y Luisi PL (2000) Liposome-assisted selective polycondensation of alphaamino acids and peptides. *Biopolymers*, 55:381–390.
- Hordijk W, y Fontanari JF (2003) Catalytic reaction sets, decay, and the preservation of information. In: Hexmoor H (Ed.) *International conference on integration of knowledge intensive multi-agent systems: KIMAS'03: Modeling, exploration, and engineering*, pp. 133–138. IEEE, New York.
- Hordijk W, y Steel M (2004) Detecting autocatalytic, self-sustaining sets in chemical reaction systems. *Journal of Theoretical Biology*, 227:451–461.
- Hordijk W, Hein J, y Steel M (2010) Autocatalytic sets and the origin of life. *Entropy*, 12(7):1733–1742.
- Joyce GF (2002) The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 418(6894):214–21.
- Kamioka S, Ajami D, y Rebek J Jr (2010) Autocatalysis and organocatalysis with synthetic structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2):541–4.
- Karsenti E (2008) Self-organization in cell biology: a brief history. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9:255–262.
- Kauffman S (1986) Autocatalytic sets of proteins. *Journal of Theoretical Biology*, 119:1–24.
- Kauffman S (1993) *The origins of order: Self-organization and selection in evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Kauffman S (1995) *At home in the universe*. Oxford University Press, Oxford.
- King GA (1978) Autocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 7:297–316.

- King GA (1982) Recycling, reproduction, and life's origins. *Biosystems*, 15(2):89–97.
- Kucerka N, Liu Y, Chu N, Petrache HI, Tristram-Nagle S, y Nagle JF (2005a) Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, 88(4):2626–37.
- Kucerka N, Tristram-Nagle S, y Nagle JF (2005b) Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *Journal of Membrane Biology*, 208(3):193–202.
- Kun A, Papp B, y Szathmáry E (2008) Computational identification of obligatorily autocatalytic replicators embedded in metabolic networks. *Genome Biology*, 9(3):R51.
- Landauer C, y Bellman K (2002) Theoretical biology: organisms and mechanisms. In: Dubois D (Ed.) *Computing Anticipatory Systems: CASYS 2001 - Fifth International Conference. AIP Conference Proceedings*, Volume 627, pp. 59–70. Springer, Liege.
- Lande MB, Donovan JM, y Zeidel ML (1995) The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *Journal of General Physiology*, 106:67–84.
- Langton CG (Ed.) (1989) *Artificial life I (Proceedings of the First Conference on Artificial Life)*. Addison-Wesley, Redwood City.
- Lee DH, Granja JR, Martinez JA, Severin K, y Ghadri MR (1996) A self-replicating peptide. *Nature*, 382(6591):525–8.
- Letelier JC, Marín G, y Mpodozis J (2003) Autopoietic and (M,R) systems. *Journal of Theoretical Biology*, 222(2):261–72.
- Letelier JC, Kuboyama T, Yasuda H, Cárdenas ML, y Cornish-Bowden A (2005) A self-referential equation, $f=f(f)$, obtained using the theory of (M,R) systems: overview and applications. In: Anai H, y Horimoto K (Eds.) *Algebraic Biology*, pp. 115–126. Universal Academy Press, Tokyo.
- Letelier JC, Soto-Andrade J, Abarzua FG, Cornish-Bowden A, y Cárdenas ML (2006) Organizational invariance and metabolic closure: Analysis in terms of (M,R) systems. *Journal of Theoretical Biology*, 238:949–961.
- Letelier JC, Cárdenas ML, y Cornish-Bowden A (2011) From L'Homme Machine to metabolic closure: steps towards understanding life. *Journal of Theoretical Biology*, 286:100–113.
- Lincoln TA, y Joyce GF (2009) Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science*, 323(5918):1229–32.
- Lloréns M, Nuño JC, Rodríguez Y, Meléndez-Hevia E, y Montero F (1999) Generalization of the theory of transition times in metabolic pathways: a geometrical approach. *Biophysical Journal*, 77(1):23–36.
- Luisi PL (2003) Autopoiesis: a review and a reappraisal. *Naturwissenschaften*, 90(2):49–59.
- Luisi PL (2006) *The Emergence of Life. From Chemical Origins to Synthetic Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Luisi PL, Walde P, y Oberholzer T (1999) Lipid vesicles as possible intermediates in the origin of life. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 4:33–39.

- Macía J, y Solé RV (2007) Protocell self-reproduction in a spatially extended metabolism-vesicle system. *Journal of Theoretical Biology*, 245(3):400–10.
- Mansy SS (2010) Membrane transport in primitive cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8):a002188.
- Mansy SS, y Szostak JW (2008) Thermostability of model protocell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:13351–13355.
- Mansy SS, Schrum JP, Krishnamurthy M, Tobe S, Treco DA, y Szostak JW (2008) Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature*, 454:122–125.
- Martin W, y Russell MJ (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1429):59–83.
- Maturana H, y Varela FJ (1973) *De máquinas y seres vivos - Una teoría sobre la organización biológica*. Editorial Universitaria S.A., Santiago de Chile.
- Maturana, H, y Varela FJ (1980) *Autopoiesis and cognition: the realisation of the living*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, The Netherlands.
- Maurer SE, Deamer DW, Boncella JM, y Monnard PA (2009) Chemical evolution of amphiphiles: glycerol monoacyl derivatives stabilize plausible prebiotic membranes. *Astrobiology*, 9(10):979–87.
- Mavelli F, y Ruiz-Mirazo K (2007a) Stochastic simulations of minimal self-reproducing cellular systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362:1789–1802.
- Mavelli F, y Ruiz-Mirazo K (2007b) Stochastic simulations of fatty-acid proto-cell models. In: Bezrukov SM (Ed.) *Proceedings of the SPIE (Conference on Noise and Fluctuations in Biological, Biophysical, and Biomedical Systems)*, Volume 6602, 66021B, pp. 1–10. Florence.
- Mavelli F, y Ruiz-Mirazo K (2010) ENVIRONMENT: a computational platform to stochastically simulate reacting and self-reproducing lipid compartments. *Physical Biology*, 7:36002.
- Mavelli F, y Ruiz-Mirazo K (2013) Theoretical conditions for the stationary reproduction of model protocells. *Integrative Biology*, 5(2):324–41.
- Mavelli F, Lerario M, y Ruiz-Mirazo K (2008) ‘ENVIRONMENT’: a stochastic simulation platform to study protocell dynamics. In: Arabnia HR, et al. (Eds.) *Proceedings of BIOCOMP 2008 (International Conference on Bioinformatics and Computational Biology)*, Volume II, pp. 934–941. CSREA Press.
- McCollom TM, Ritter G, y Simoneit BRT (1999) Lipid synthesis under hydrothermal conditions by Fischer-Tropsch-type reactions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 29:153–166.
- Meinhardt H (1982) *Models of biological pattern formation*. Academic Press, London.
- Monnard PA, y Deamer DW (2001) Nutrient uptake by protocells: a liposome model system. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(1–2):147–55.

- Monnard PA, y Deamer DW (2002) Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *Anatomical Record*, 268(3):196–207.
- Monnard PA, y Deamer DW (2003) Preparation of vesicles from nonphospholipid amphiphiles. *Methods in Enzymology*, 372:133–51.
- Monnard PA, Apel CL, Kanavarioti A, y Deamer DW (2002) Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly and polymerization processes related to early forms of life: implications for a prebiotic aqueous medium. *Astrobiology*, 2(2):139–52.
- Montero F, y Morán F (1992) *Biofísica. Procesos de autoorganización en biología*. Eudema, Madrid.
- Montero F, Nuño JC, Meléndez-Hevia E, Olasagasti F, Vázquez S, y Morán F (2008) Stoichiometric analysis of self-maintaining metabolisms. *Journal of Theoretical Biology*, 252(3):427–432.
- Morán F, Moreno A, Minch E, y Montero F (1996) Further steps towards a realistic description of the essence of life. In: Langton CG, y Shimohara K (Eds.) *Artificial life V (Proceedings of the Fifth Conference on Artificial Life)*, pp. 255–263. MIT Press, Cambridge, MA.
- Moreno A, y Ruiz-Mirazo K (1999) Metabolism and the problem of its universalization. *Biosystems*, 49(1):45–61.
- Morigaki K, y Walde P (2007) Fatty acid vesicles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12:75–80.
- Morigaki K, Walde P, Misran M, y Robinson BH (2003) Thermodynamic and kinetic stability. Properties of micelles and vesicles formed by the decanoic acid/decanoate system. *Colloids and Surfaces A*, 213:37–44.
- Morowitz HJ (1968) *Energy Flows in Biology*. Academic Press, New York.
- Morowitz HJ (1992) *Beginnings of cellular life: metabolism recapitulates biogenesis*. Yale University Press, New Haven.
- Namani T, y Deamer DW (2008) Stability of model membranes in extreme environments. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 38(4):329–41.
- Namani T, y Walde P (2005) From decanoate micelles to decanoic acid/dodecylbenzenesulfonate vesicles. *Langmuir*, 21(14):6210–9.
- Nealson K (1999) What are the smallest viable organisms actually encountered in the various environments? In: *Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop*. National Academy Press, Washington.
- Nelson DL, y Cox MM (2004) *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). WH Freeman.
- Nicolis G, y Prigogine Y (1977) *Self-organization in non-equilibrium systems*. Wiley, New York.
- Northrup SH, y Erickson HP (1992) Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:3338–3342.

Olasagasti F, Kim HJ, Pourmand N, y Deamer DW (2011) Non-enzymatic transfer of sequence information under plausible prebiotic conditions. *Biochimie*, 93:556–561.

Oliver AE, y Deamer DW (1994) Alpha-helical hydrophobic polypeptides form proton-selective channels in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 66(5):1364–79.

Oparin AI (1924) *The origin of life*. Izd. Moskovshii Rabochii, Moscow. [English translation in Oparin AI (1967) *The origin of life*. JD Bernal (Ed.), pp. 199–234. Weidenfeld & Nicolson, London].

Oparin AI (1961) *Life: its nature, origin and development*. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Orgel LE (1998) The origin of life—how long did it take? *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(1):91–6.

Ourisson G, y Nakatani Y (1994) The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry and Biology*, 1(1):11–23.

Paul N, y Joyce GF (2002) A self-replicating ligase ribozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20):12733–40.

Paula S, Volkov AG, Van Hoek AN, Haines TH, y Deamer DW (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal*, 70(1):339–48.

Peretó J, López-García P, y Moreira D (2004) Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(9):469–77.

Pfeiffer T, Sanchez-Valdenebro I, Nuño JC, Montero F, y Schuster S (1999) METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics*, 15:251–257.

Piedrafita G, Montero F, Morán F, Cárdenas ML, y Cornish-Bowden A (2010) A simple self-maintaining metabolic system: robustness, autocatalysis, bistability. *PLoS Computational Biology*, 6(8):e1000872. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000872.

Piedrafita G, Mavelli F, Morán F, y Ruiz-Mirazo K (2011) On the transition from prebiotic to proto-biological membranes: from ‘self-assembly’ to ‘self-production’. In: Kamps G, Karsai I, y Szathmáry E (Eds.) *ECAL 2009 Proceedings. Advances in Artificial Life. Darwin Meets von Neumann*. Lecture Notes in Computer Science, Volume 5777 (Part I), pp. 256–264. Springer, Berlín.

Piedrafita G, Cornish-Bowden A, Morán F, y Montero F (2012a) Size matters: influence of stochasticity on the self-maintenance of a simple model of metabolic closure. *Journal of Theoretical Biology*, 300:143–151. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.01.013.

Piedrafita G, Ruiz-Mirazo K, Monnard PA, Cornish-Bowden A, y Montero F (2012b) Viability conditions for a compartmentalized protometabolic system: a semi-empirical approach. *PLoS One*, 7(6):e39480. doi: 10.1371/journal.pone.0039480.

Pohorille A, y Deamer D (2009) Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Research in Microbiology*, 160:449–456.

Prigogine Y, y Stengers I (1979) *La nouvelle alliance. Métamorphose de la science*. Gallimard, Paris.

- Rebek J Jr (1992) Molecular recognition and self-replication. *Journal of Molecular Recognition*, 5(3):83–8.
- Rocheleau T, Rasmussen S, Nielsen PE, Jacobi MN, y Ziock H (2007) Emergence of protocellular growth laws. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362:1841–1845.
- Rosen R (1972) Some relational cell models: the metabolism-repair system. In: Rosen R (Ed.) *Foundations of Mathematical Biology*. Academic Press, New York.
- Rosen R (1958a) The representation of biological systems from standpoint of the theory of categories. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 20:317–341.
- Rosen R (1958b) A relational theory of biological systems. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 20:245–341.
- Rosen R (1959) A relational theory of biological systems II. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 21:109–128.
- Rosen R (1991) *Life itself*. Columbia University Press, New York.
- Rudomin I (1999) *Vida artificial*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rudrauf D, Lutz A, Cosmelli D, Lachaux JP, y Van Quyen ML (2003) From autopoiesis to neurophenomenology: Francisco Varela's exploration of the biophysics of being. *Biological Research*, 36:27–65.
- Ruiz-Mirazo K (2013) Self-organization. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, y Yokota H (Eds.) *Encyclopedia of Systems Biology*. Springer, New York (in press).
- Ruiz-Mirazo K, y Mavelli F (2008) On the way towards 'basic autonomous agents': stochastic simulations of minimal lipid-peptide cells. *Biosystems*, 91(2):374–87.
- Ruiz-Mirazo K, y Moreno A (2004) Basic autonomy as a fundamental step in the synthesis of life. *Artificial Life*, 10:235–259.
- Ruiz-Mirazo K, Piedrafita G, Ciriaco F, y Mavelli F (2011) Stochastic simulations of mixed-lipid compartments: from self-assembling vesicles to self-producing protocells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 696:689–696. doi: 10.1007/978-1-4419-7046-6_70.
- Ruiz-Mirazo K, Briones C, y de la Escosura A (2013) Prebiotic systems chemistry: new perspectives for the origins of life. *Chemical Reviews*, en prensa.
- Sacerdote MG, y Szostak JW (2005) Semipermeable lipid bilayers exhibit diastereoselectivity favoring ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:6004–6008.
- Sato C, Nakamura J, y Nakamaru Y (2000) A chemometric approach to the estimation of the absorption spectra of dye probe merocyanine 540 in aqueous and phospholipid environments. *Journal of Biochemistry*, 127(4):603–10.
- Schrödinger E (1944) *What is life? The physical aspect of the living cell*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Schuster P (1984) Polynucleotide evolution, hypercycles and the origin of the genetic code. *Advances in Space Research*, 4:143–51.
- Segré D, y Lancet D (2000) Composing life. *EMBO Reports*, 1(3):217–22.
- Segré D, Lancet D, Kedem O, y Pilpel Y (1998) Graded autocatalysis replication domain (GARD): kinetic analysis of self-replication in mutually catalytic sets. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(4-6):501–14.
- Segré D, Ben-Eli D, Deamer DW, y Lancet D (2001) The lipid world. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(1-2):119–45.
- Shapiro R (2007) A simpler origin for life. *Scientific American*, 296(6):46–53.
- Sievers D, y Von Kiedrowski G (1994) Self-replication of complementary nucleotide-based oligomers. *Nature*, 369:221–224.
- Skulachev VP (1992) The laws of cell energetics. *European Journal of Biochemistry*, 208:203–209.
- Solé RV, Manrubia SC, Luque B, Delgado J, y Bascompte J (1996) Phase transitions and complex systems. *Complexity*, 1:13–26.
- Stano P, y Luisi PL (2010) Achievements and open questions in the self-reproduction of vesicles and synthetic minimal cells. *Chemical Communications*, 46:3639–3653.
- Stano P, Wehrli E, y Luisi PL (2006) Insights into the self-reproduction of oleate vesicles. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18:S2231–S2238.
- Szathmáry E (2007) Coevolution of metabolic networks and membranes: the scenario of progressive sequestration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1486):1781–7.
- Szathmáry E, Santos M, y Fernando C (2005) Evolutionary potential and requirements for minimal protocells. *Topics in Current Chemistry*, 259:167–211.
- Szostak JW, Bartel DP, y Luisi PL (2001) Synthesizing life. *Nature*, 409:387–390.
- Thomas JA, y Rana FR (2007) The influence of environmental conditions, lipid composition, and phase behavior on the origin of cell membranes. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 37(3):267–85.
- Vaidya N, Manapat ML, Chen IA, Xulvi-Brunet R, Hayden EJ, y Lehman N (2012) Spontaneous network formation among cooperative RNA replicators. *Nature*, 491(7422):72–77.
- Varela FG, Maturana HR, y Uribe R (1974) Autopoiesis: the organization of living systems, its characterization and a model. *Currents in Modern Biology*, 5:187–96.
- Vasas V, Szathmáry E, y Santos M (2010) Lack of evolvability in self-sustaining autocatalytic networks constraints metabolism-first scenarios for the origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4):1470–5.
- Vasas V, Fernando C, Santos M, Kauffman S, y Szathmáry E (2012) Evolution before genes. *Biology Direct*, 7:1.

- Wächtershäuser G (1988) Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiological Reviews*, 52(4):452–84.
- Wächtershäuser G (1990) Evolution of the first metabolic cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1):200–4.
- Walde P (2006) Surfactant assemblies and their various possible roles for the origin(s) of life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 36:109–150.
- Walde P, Wick R, Fresta M, Mangone A, y Luisi PL (1994a) Autopoietic self-reproduction of fatty acid vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 116:11649–11654.
- Walde P, Goto A, Monnard PA, Wessicken M, y Luisi PL (1994b) Oparin's reactions revisited: Enzymatic synthesis of poly(adenylic acid) in micelles and self-reproducing vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 116:7541–7547.
- Walde P, Namani T, Morigaki K, y Hauser H (2006) Formation and properties of fatty acid vesicles (liposomes). In: Gregoriadis G (Ed.) *Liposome Technology* (3rd ed.), pp. 1–19. Informa Healthcare, New York.
- Westheimer FH (1987) Why nature chose phosphates. *Science*, 235(4793):1173–8.
- Wilhelm T (2009) The smallest chemical reaction system with bistability. *BMC Systems Biology*, 3:90.
- Wolkenhauer O (2001) Systems biology: the reincarnation of systems theory applied in biology? *Briefings in Bioinformatics*, 2(3):258–270.
- Zepic HH, Rajamani S, Maurel MC, y Deamer DW (2007) Oligomerization of thioglutamic acid: encapsulated reactions and lipid catalysis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 37(6):495–505.
- Zhu TF, y Szostak JW (2009) Coupled growth and division of model protocell membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 131:5705–5713.